



**Josiane  
Callegaro  
Raguzzoni**

**Amidos crioulos: caracterização fundamental e  
influência de biopolímeros nas propriedades  
funcionais do amido**





**Josiane  
Callegaro  
Raguzzoni**

**Amidos crioulos: caracterização fundamental e influência de biopolímeros nas propriedades funcionais do amido**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e sob a coorientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro do POCTI 2010 no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.



Apoio financeiro do Programa AlBan, da FCT e do POPH/FSE.





Dedico este trabalho a minha família e ao meu esposo  
(Danilo D'Elia do Nascimento), os maiores tesouros da minha vida.



*“I have walked that long road to freedom. I have tried not to falter. I have made missteps along the way. But I have discovered the secret that after climbing a great hill, one only finds that there are many more hills to climb. I have taken a moment here to rest, to steal a view of the glorious vista that surrounds me, to look back on the distance I have come. But I can only rest for a moment, for with freedom come responsibilities, and I dare not linger, for my long walk is not ended.”*

Nelson Mandela





## **o júri**

### **Presidente**

Doutor Aníbal Guimarães da Costa  
Professor Catedrático  
Universidade de Aveiro

Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa  
Professora Catedrática Aposentada  
Universidade de Lisboa

Doutora Ivonne Delgadillo  
Professora Associada com Agregação  
Universidade de Aveiro (orientadora)

Doutor António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente  
Professor Associado com Agregação  
Universidade do Minho

Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva  
Professor Associado com Agregação  
Universidade de Aveiro

Doutora Dulcineia Maria de Sousa Ferreira Wessel  
Professora Adjunta  
Escola Superior Agrária de Viseu



## **agradecimentos**

Ao finalizar esta longa jornada deixo aqui expressa, em poucas palavras, a minha gratidão a todos que contribuíram para a conclusão deste meu grande desafio.

À minha família em geral, minha saudade maior... (principalmente aos meus pais aos quais devo qualquer mérito, pois se aqui cheguei foi por todo esforço que fizeram para me oferecer a melhor educação pessoal e profissional possível). Muito obrigada com muito amor!

Ao meu esposo, amigo e companheiro. Foi a pessoa que vivenciou comigo as vitórias e desilusões dando-me incondicionalmente seu apoio, amor e ajudando-me a ser perseverante. Acalentou meu coração sempre que precisei da maneira mais carinhosa possível. Sorriu comigo, chorou comigo, deu-me colo dia após dia. Não encontro maneira verbal para agradecer por tudo meu amor. Serei eternamente grata por estar sempre ao meu lado. Te amo Dani!

A Deus, energia superior, que nos momentos de dificuldade deu-me força e fé para não esmorecer.

À Professora Doutora Ivonne Delgadillo (orientadora) e ao Professor Doutor José Lopes da Silva (coorientador) pela oportunidade de aprendizado profissional, ajuda e pelo auxílio no desenvolvimento pessoal da mais difícil virtude humana, a paciência (“capacidade de suportar dificuldades de toda ordem, persistir em uma atividade difícil, de esperar o momento certo e de tentar manter um controlo emocional equilibrado ao longo do tempo...”).

Ao Professor Doutor Marcelo Maraschin da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Brasil) que foi o elo para o início desta jornada (assim como ao Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar - SINTRAF e ao Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade - *NeaBio*).

À Universidade de Aveiro (UA - Portugal), ao Departamento de Química, à Unidade de Investigação de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares e às organizações financiadoras desta pesquisa.

A todos os amigos de longa data que sempre acreditaram e torceram por mim e aos amigos que fiz aqui deste lado do oceano. Assim como a todos os colegas e amigos do grupo da UA que em diversos momentos muito me ajudaram.

Por fim, agradeço por todas as vivências que tive, aos momentos de felicidade e não menos aos momentos de dificuldade e tristeza que me fazem concluir esta etapa de minha vida mais forte e evoluída.

Muito obrigada!



## Palavras-chave

Amido de milho crioulo, quitosana, galactomananas, biopolímeros, caracterização, gelatinização, retrogradação, propriedades funcionais, propriedades térmicas, reologia, microscopia, espectroscopia de infravermelho médio.

## Resumo

O trabalho apresentado nesta tese focou-se no estudo do amido, nomeadamente na avaliação das características físico-químicas, morfológicas, térmicas e reológicas do amido de seis variedades de milho crioulo, preservadas no estado de Santa Catarina (Brasil), com o intuito de contribuir para a valorização e preservação de variedades locais que são cultivadas em sistemas de produção orgânica, também conhecidas como variedades crioulas. Estas sementes são importantes quer para a preservação da biodiversidade quer para os pequenos produtores que as conservam e as produzem fazendo uso de uma agricultura sustentável e independente comercialmente. Para além da caracterização dos amidos crioulos foram também analisadas as alterações que ocorrem nos processos de gelatinização e retrogradação do amido quando realizados na presença de outros biopolímeros, nomeadamente a quitosana e galactomananas.

No Capítulo I é apresentada uma breve revisão do conhecimento científico sobre o amido e sobre a quitosana e galactomananas, os outros biopolímeros utilizados. Igualmente é feita uma sucinta abordagem sobre as principais técnicas analíticas que foram utilizadas: reologia fundamental, calorimetria diferencial de varrimento, microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de infravermelho médio. No capítulo II apresenta-se o isolamento dos amidos das seis variedades de milho crioulo e a sua caracterização junto com um amido comercial usado como modelo de comparação. Os amidos apresentaram genericamente características físico-químicas semelhantes e o amido extraído das variedades crioulas MT e MPA 01 apresentaram menor temperatura de gelatinização e maior percentagem de retrogradação, respetivamente. Os efeitos da adição da quitosana e de três galactomananas (goma guar, goma de alfarroba e goma cassia) em sistemas mistos com o amido são analisados nos Capítulos III e IV respetivamente. A adição dos biopolímeros aos amidos resultou no aumento das temperaturas de gelatinização, na alteração da retrogradação do amido pelas galactomananas e na alteração das propriedades viscoeláticas dos géis formados. Os dados de infravermelho esclareceram que nos sistemas com quitosana, o amido formou complexos com o ácido acético usado para dissolver a quitosana e que esta por sua vez formou acetato de quitosana. O comportamento durante a gelatinização do amido comercial quando comparado com o amido do milho crioulo MPA na sua interação com as galactomananas é diferenciado.



**Keywords**

Maize landrace starch, chitosan, galactomannans, biopolymers, characterization, gelatinization, retrogradation, functional properties, thermal properties, rheology, microscopy, mid infrared spectroscopy.

**Abstract**

The work presented in this thesis was focused on the starch study, namely the assessment of physicochemical, morphological, thermal and rheological characteristics from starch from six varieties of maize landrace, preserved in the state of Santa Catarina (Brazil) and contributing to the valorization and preservation of local varieties that are grown in organic production systems, also known as landraces. These seeds are important, both for the preservation of biodiversity and for the small producers who preserve and produce them, making use of sustainable agriculture being commercially independent. Besides to the characterization of landraces starches, were also analyzed the changes occurring in the process of gelatinization and retrogradation, when performed in the presence of other biopolymers, including chitosan and galactomannans.

Chapter I is a brief review of the scientific knowledge on starch and on chitosan and galactomannans, the other biopolymers used. The main analytical techniques used, were also briefly described: fundamental rheology, differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy and mid-infrared spectroscopy. Chapter II describes the isolation of the six varieties of maize landraces starch and their characterization together with a commercial starch used as comparison model. In general, starches have similar physico-chemical characteristics and starch extracted from landraces varieties MT and MPA 01 had lower gelatinization temperature and higher percentage of retrogradation, respectively. The effects of the addition of chitosan and three galactomannans (guar gum, locust bean gum and cassia gum) in mixed systems with starch are analyzed in Chapters III and IV respectively. The addition of the biopolymers to starches resulted in increased gelatinization temperature, changes in starch retrogradation (galactomannans) and changes in the viscoelastic properties of gels formed. Infrared spectra elucidated that in systems with chitosan, starch formed complexes with the acetic acid used to dissolve the chitosan and on the other side chitosan formed chitosan acetate. The commercial starch behaved during gelatinization differently when compared with the maize landrace starch MPA interacting with the galactomannans.





## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

**Å:** ångström (unidade de medida de comprimento de onda, parâmetro de difração de raios-X)

**ATR:** reflectância total atenuada (*attenuated total reflectance*)

**b.s.:** base seca

**BR:** Branco (variedade de milho crioulo)

**C:** carbono

**CLSM:** microscopia confocal de varrimento a laser (*confocal laser scanning microscopy*)

**COM:** amido de milho comercial (Maizena®)

**CV:** Cateto Vermelho (variedade de milho crioulo)

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DP:** grau de polimerização

**DSC:** calorimetria diferencial de varrimento (*differential scanning calorimetric*)

**FID:** detetor de ionização de chama (*flame ionization detector*)

**g:** força de centrifugação

**G':** módulo de conservação de energia ou elástico (parâmetro reológico)

**G'':** módulo de perda de energia ou viscoso (parâmetro reológico)

**G' máx:** valor máximo alcançado pelo módulo (parâmetro reológico)

**GA:** goma de alfarroba

**Gal:** galactose

**GC:** goma cassia

**GC-MS:** cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (*gas chromatography-mass spectrometry*)

**GG:** goma guar

**GLC:** glucose

**HCA:** análise por agrupamento hierárquico (*hierarchical cluster analysis*, quimiometria)

**I<sub>2</sub>:** iodo

**IR:** infravermelho (*infra red*)

**KI:** iodeto de potássio

**kPa:** quilo pascal (unidade de medida reológica: Pa/1000)

**LVR:** região viscoelástica linear (*linear viscoelastic region*, análises reológicas)

**M/G:** razão entre as frações de manose e galactose

**m/m:** massa/massa

**Man:** manose

**MEV:** microscopia eletrônica de varrimento

**MID-IR:** espectroscopia de infravermelho médio (*mid infrared spectroscopy*)

**MPA:** MPA 01 (variedade de milho crioulo)

**MT:** Mato Grosso (variedade de milho crioulo)

***M<sub>v</sub>*:** massa molecular média viscosimétrica

**n.d.:** não detetado.

**N:** nitrogênio

**NaHSO<sub>3</sub>:** bissulfito de sódio

**NMR:** espectroscopia de ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*)

**P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:** pentóxido de fósforo

**Pa:** pascal (unidade padrão de tensão no sistema internacional de unidades, medida reológica)

**PCA:** análise de componentes principais (*principal component analysis*, quimiometria)

**pH:** potencial de hidrogênio

***PHI*:** índice de altura do pico (*peak height index*, parâmetro térmico)

**PIR:** Pires (variedade de milho crioulo)

**PIX:** Pixurum (variedade de milho crioulo)

**pK<sub>a</sub>:** constante de acidez

**PLS:** regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least square*, quimiometria)

**Q:** quitosana

**R:** percentagem de retrogradação (parâmetro térmico)

**rad/s:** radiano por segundo (unidade de medida padrão para velocidade angular, medida reológica)

***R<sub>gel</sub>*:** faixa de temperatura de gelatinização (parâmetro térmico)

**rpm:** rotações por minuto

***R<sub>ret</sub>*:** faixa de temperatura de retrogradação (parâmetro térmico)

**RVA:** analisador de viscosidade (*rapid visco analyser*)

**SDS:** dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

**T<sub>0</sub>:** temperatura inicial (parâmetro térmico)

**$\tan \delta$** : tangente do ângulo de perda (parâmetro reológico)

**$T_c$** : temperatura de conclusão (parâmetro térmico)

**TG**: temperatura inicial do processo de gelatinização

**$T_p$** : temperatura de pico (parâmetro térmico)

**TP**: temperatura de pico do processo de gelatinização

**u.a**: unidade arbitrária

**v/v**: volume/volume

**vs**: versus (contra)

**WAXS**: difração de raios-X (*wide angle X-ray diffraction*)

**$\gamma$** : deformação (parâmetro reológico)

**$\eta_{sp}$** : viscosidade específica

**$\eta_{rel}$** : viscosidade relativa

**$\theta$** : ângulo de Bragg (difração de raios-X)

**$\lambda$** : radiação (difração de raios-X)

**$\sigma$** : tensão (parâmetro reológico)

**$\omega$** : frequência (parâmetro reológico)

**$[\eta]$** : viscosidade intrínseca

**$\Delta H$** : entalpia (parâmetro térmico)

**$\Delta H_{gel}$** : entalpia de gelatinização (parâmetro térmico)

**$\Delta H_{ret}$** : entalpia de retrogradação (parâmetro térmico)

**$\approx$** : aproximadamente

**$\leq$** : menor ou igual

**$\geq$** : maior ou igual

**$\uparrow$** : aumento

**$\downarrow$** : diminuição



## ÍNDICE GERAL

---

O júri.....	I
Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Abreviaturas e Símbolos.....	IX
Índice Geral.....	XIII
Prefácio.....	XIX

---

### **Capítulo 1- Revisão Bibliográfica ..... 3**

1.1 AMIDO E SUA IMPORTÂNCIA.....	3
1.1.1 O Amido .....	3
1.1.2 Propriedades Funcionais do Amido (gelatinização e retrogradação) .....	8
1.1.3 Usos do Amido na Indústria .....	10
1.2 QUITOSANA .....	12
1.3 GALACTOMANANAS .....	14
1.3.1 Goma Guar.....	16
1.3.2 Goma de Alfarroba .....	16
1.3.3 Goma Cassia .....	16
1.4 INTERAÇÕES ENTRE O AMIDO E OUTROS POLISSACARÍDEOS .....	17
1.5 REVISÃO DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....	19
1.5.1 Reologia.....	19
1.5.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	23
1.5.3 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) .....	24
1.5.4 Espectroscopia de Infravermelho Médio (MID-IR) .....	25

### **Capítulo 2- Isolamento e Caracterização dos Amidos de Variedades de Milhos Crioulos Brasileiros (*Zea mays* L.) ..... 33**

2.1 INTRODUÇÃO.....	31
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.2.1 Materiais .....	34
2.2.2 Métodos .....	36

2.2.2.1 Isolamento do Amido .....	36
2.2.2.2 Determinação do Teor de Humidade.....	38
2.2.2.3 Determinação do Teor de Cinzas ou Resíduo Mineral.....	38
2.2.2.4 Determinação do Teor de Proteínas.....	38
2.2.2.5 Determinação do Teor de Lípidos .....	38
2.2.2.6 Determinação do Teor de Amido Total.....	39
2.2.2.7 Determinação do Teor de Amido Danificado.....	39
2.2.2.8 Determinação do Teor de Amilose – Método Colorimétrico por Afinidade ao Iodo .....	39
2.2.2.9 Determinação do Teor de Amilose – Método Enzimático .....	40
2.2.2.10 Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) .....	41
2.2.2.11 Determinação do Poder de Inchamento dos Grânulos .....	41
2.2.2.12 Difração de Raios-X (WAXS).....	41
2.2.2.13 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	42
2.2.2.13.1 Gelatinização dos Amidos .....	42
2.2.2.13.2 Retrogradação dos Amidos.....	43
2.2.2.14 Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS): Análise das Ligações Glucosídicas.....	43
2.2.2.15 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR) e Quimiometria.....	46
2.2.2.16 Caracterização do Comportamento Reológico – Propriedades Dinâmicas .....	47
2.2.2.17 Análises Estatísticas .....	49
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.3.1 Isolamento dos Amidos .....	50
2.3.2 Composição dos Amidos Isolados.....	52
2.3.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) .....	56
2.3.4 Difração de Raios-X (WAXS).....	62
2.3.5 Poder de Inchamento dos Grânulos .....	65
2.3.6 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	69
2.3.6.1 Gelatinização dos Amidos .....	70
2.3.6.2 Retrogradação dos Amidos.....	74

2.3.7 Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS): Análise das Ligações Glucosídicas .....	79
2.3.8 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR) e Quimiometria .....	81
2.3.9 Caracterização do Comportamento Reológico – Propriedades Dinâmicas .....	90
2.3.9.1 Varrimento em Temperatura .....	91
2.3.9.2 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos .....	102
2.4 CONCLUSÕES .....	105

**Capítulo 3- Influência de um Polissacarídeo Catiônico, a Quitosana, na Gelatinização e Retrogradação do Amido ..... 111**

3.1 INTRODUÇÃO .....	113
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	118
3.2.1 Materiais .....	118
3.2.2 Métodos .....	118
3.2.2.1 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR).....	118
3.2.2.2 Preparação dos Sistemas Mistos de Amido e Quitosana.....	119
3.2.2.3 Caracterização do Comportamento Reológico .....	120
3.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) .....	121
3.2.2.5 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR) .....	121
3.2.2.6 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	121
3.2.2.6.1 Efeito da Quitosana na Gelatinização do Amido .....	121
3.2.2.6.2 Efeito da Quitosana na Retrogradação do Amido .....	122
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
3.3.1 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR).....	123
3.3.2 Caracterização do Comportamento Reológico .....	125
3.3.2.1 Varrimento em Temperatura .....	126
3.3.2.1.1 Efeito da Diminuição do pH (presença de ácido acético) .....	126

3.3.2.1.2 Efeito da Adição da Quitosana Durante o Varrimento em Temperatura .....	133
3.3.2.2 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos .....	142
3.3.2.3 Varrimento em Tempo – Maturação .....	146
3.3.2.4 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos .....	150
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) .....	152
3.3.4 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR).....	160
3.3.5 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	168
3.3.5.1 Efeito da Quitosana na Gelatinização do Amido .....	168
3.3.5.2 Efeito da Quitosana na Retrogradação do Amido .....	170
3.4 CONCLUSÕES .....	173

#### **Capítulo 4- Influência de Galactomananas, Polissacarídeos Neutros, na Gelatinização e Retrogradação do Amido .....**

4.1 INTRODUÇÃO .....	179
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	186
4.2.1 Materiais .....	186
4.2.2 Caracterização das Galactomananas .....	186
4.2.2.1 Determinação da Razão de Manose/Galactose por Cromatografia em Fase Gasosa .....	186
4.2.2.2 Determinação da Viscosidade Intrínseca e da Massa Molecular Viscosimétrica .....	187
4.2.3 Preparação dos Sistemas Mistos de Amido e Galactomananas.....	188
4.2.4 Caracterização do Comportamento Reológico .....	188
4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) .....	189
4.2.6 Microscopia Confocal de Varrimento a Laser (CLSM) .....	189
4.2.7 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR) .....	190
4.2.8 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) .....	190
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	192
4.3.1 Caracterização das Galactomananas .....	192
4.3.1.1 Determinação da Razão de Manose/Galactose por Cromatografia	



<i>em Fase Gasosa</i> .....	192
4.3.1.2 <i>Determinação da Viscosidade Intrínseca e da Massa Molecular Viscosimétrica</i> .....	193
4.3.2 <i>Caracterização do Comportamento Reológico</i> .....	194
4.3.2.1 <i>Varrimento em Temperatura</i> .....	194
4.3.2.2 <i>Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos</i> .....	204
4.3.2.3 <i>Varrimento em Tempo – Maturação</i> .....	206
4.3.2.4 <i>Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos</i> .....	210
4.3.3 <i>Análises Microscópicas</i> .....	211
4.3.3.1 <i>Microscopia Confocal de Varrimento a Laser (CLSM)</i> .....	212
4.3.3.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV)</i> .....	217
4.3.4 <i>Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)</i> .....	221
4.3.5 <i>Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)</i> .....	230
4.3.5.1 <i>Efeito das Galactomananas na Gelatinização do Amido</i> .....	231
4.3.5.2 <i>Efeito das Galactomananas na Retrogradação do Amido</i> .....	235
4.4 <b>CONCLUSÕES</b> .....	238
 <b>Capítulo 5- Conclusões Finais e Sugestões para Trabalhos Futuros</b> .....	<b>243</b>
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>249</b>



## PREFÁCIO

---

Utilizados quer para consumo humano quer para consumo animal, os cereais podem ser considerados como a fonte básica da alimentação mundial. A sua utilização remonta a séculos enaltecendo culturas de antigas civilizações e fomentando a sobrevivência de muitos povos que até os dias atuais, por muitas vezes, os utilizam como alimento único diário. Desde os primórdios da agricultura, o homem seleciona e conserva sementes para o seu sustento, porém sabe-se que a agrobiodiversidade está sendo afetada devido, por exemplo, às constantes alterações climáticas, práticas de cultivo utilizadas na atualidade e necessidades de mercado.

O Brasil é um país que detém uma grande diversidade no que se refere à agricultura e, no entanto, assim como em outros lugares, necessita de ações que possam ajudar a conservar este património e que possam contribuir para a preservação dos conhecimentos de culturas locais associados aos cultivos agrícolas. O resgate destes materiais genéticos é impreterível não só pela importância que representam para as populações que os conservam, como também para valorizar e preservar a biodiversidade e também para introduzir no mercado novas matérias-primas potencialmente vantajosas.

Partindo-se desta premissa é que surgiu a proposta do presente trabalho. Na região sul do Brasil, especialmente na cidade de Anchieta – Estado de Santa Catarina, a agricultura praticada está fundamentada na produção familiar que vem conservando e melhorando uma série de variedades locais de diversas espécies, também conhecidas como sementes crioulas. Estas sementes não necessitam de aporte químico para sua defesa constituindo uma agricultura ecológica e que fornece produtos livres de agrotóxicos.

As vantagens para estes pequenos agricultores em cultivar estas variedades locais, para além da adaptação à intempéries climáticas e do baixo custo das sementes, incluem a conservação do seu potencial de produção, a possível obtenção de alimentos com

características benéficas e a autonomia do próprio produtor. Não obstante os esforços para a conservação das variedades locais, muitas vêm sendo perdidas com o passar do tempo, o que acarreta grande dano à biodiversidade para além do detrimento dos conhecimentos informais gerados por estes pequenos agricultores acerca do uso e manejo destas variedades. Estes conhecimentos adquiridos permitiram a adaptação destas sementes às condições de cultivo encontradas nestas regiões, a sua seleção e conservação. Os motivos pelos quais estas variedades estão em risco advêm desde o êxodo destas famílias (que por muitos fatores são obrigadas a deixarem suas terras e todo este legado) até à troca do cultivo das variedades locais pelos novos pacotes tecnológicos que envolvem o uso de sementes comerciais. Por sua vez, os custos de produção necessários para o plantio das sementes comerciais não conseguem ser suportados por muitos destes agricultores regionais, o que influencia o abandono da vida rural.

Uma das formas de incentivar à proteção e utilização destas variedades únicas, e de apoiar o desenvolvimento de novas variedades ainda mais adaptadas a certas condições ambientais, é a valorização através de estudos fundamentais destes materiais que ajudem a distinguir potenciais matérias-primas que possam vir a apresentar características específicas de uso e de ascensão mercadológica. Para tal, foram firmadas parcerias, como por exemplo, entre os pequenos agricultores (leia-se Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar - SINTRAF) e o núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*) da Universidade Federal do Estado de Santa Catarina. A partir desta parceria diversos estudos têm sido desenvolvidos em variedades locais. Tem sido dada especial atenção ao milho crioulo que representa um cultivo de bastante expressão para a região e que apresenta bastante variabilidade das suas características. Esta conexão criada entre os pequenos produtores e o setor acadêmico tem auxiliado no desenvolvimento e reconhecimento desta região agrícola gerando conhecimentos científicos destas variedades e proporcionando retorno aos agricultores, proteção e valorização da agrobiodiversidade existente nesta localidade para além, como anteriormente referido, da possibilidade de identificação de potenciais matérias-primas para a indústria.

Com o intuito de promover e incentivar a pesquisa através da troca de conhecimentos, no ano de 2005 outra parceria foi firmada entre a Universidade Federal de

Santa Catarina (UFSC) – Brasil e a Universidade de Aveiro (UA) – Portugal. A partir desta data tiveram início diversos trabalhos de colaboração que envolvem o intercâmbio em programas de formação. A frente desta parceria está o Prof. Dr. Marcelo Maraschin do núcleo *Neabio* e coordenador do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Departamento de Agronomia - UFSC) e a Prof. Dr<sup>a</sup> Ivonne Delgadillo coordenadora do Laboratório de Bioquímica e Química de Alimentos (Departamento de Química – UA). Através desta parceria foi idealizada a realização do presente trabalho de doutoramento desenvolvido na Unidade de Investigação de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares da UA. Foram selecionadas seis variedades de milho crioulo objetivando-se analisar o potencial da fração amídica deste material.

O milho é uma das principais fontes de amido e este, por sua vez, é um dos biopolímeros mais utilizados comercialmente apresentando características reconhecidamente únicas, o que faz com que seus comportamentos não possam ser generalizados. Na área alimentar, pode-se dizer que agricultores, indústrias e consumidores buscam por matérias-primas/produtos que apresentem características especiais. Modificações nas matérias nativas estão em crescente desaprovação e com restrições devido à proteção ao consumidor e meio ambiente além da economia na produção. Estes fatores justificam a caracterização e estudo destes amidos crioulos que auxiliará no seu direcionamento para o uso industrial de acordo com sua composição e propriedades funcionais. Desta forma o presente trabalho estará ajudando a agregar valor a este material genético ainda não explorado quanto as suas potencialidades para fins industriais.

Os alimentos processados que consumimos são sistemas complexos constituídos pela mistura de diferentes ingredientes que são responsáveis pelas características finais dos produtos. O conhecimento das interações que ocorrem entre estes constituintes reveste-se de particular valor, seja para o melhoramento de processos e qualidade final ou para o desenvolvimento de novas formulações. Neste íterim, devido à importância comercial dos produtos alimentares industrializados que contém amido em sua formulação, diversos estudos são constantemente realizados para melhor compreender as interações que ocorrem entre o amido e outros biopolímeros quando estes são misturados. Por conseguinte, a análise do efeito de diferentes biopolímeros sobre as propriedades funcionais do amido

também foi delineada no presente trabalho. Para tal escolheu-se a quitosana e três galactomananas. A quitosana é um biopolímero catiónico, amplamente utilizado como ingrediente funcional, que apresenta características específicas e as potenciais interações com o amido, principalmente no que toca às alterações nos processos de gelatinização e retrogradação do amido, é um tópico a ser estudado. As galactomananas são biopolímeros neutros e entre as utilizadas neste trabalho destaca-se a goma cassia, que nos últimos anos foi aprovada para uso alimentar com perspectivas de ser um excelente agente espessante, ainda pouco explorado cientificamente. Complementarmente, para efeitos de comparação, foram utilizadas outras duas galactomananas comercialmente disponíveis e bastante conhecidas, nomeadamente a goma guar e a goma de alfarroba, sendo esta escolha baseada nos diferentes padrões de ramificação que estes polissacarídeos apresentam.

Assim, esta tese de doutoramento teve como objetivo principal a valorização do amido extraído a partir das seis variedades de milho crioulo, através do estudo fundamental da sua composição e propriedades funcionais. Além da caracterização dos amidos crioulos também o objetivo da análise do efeito de diferentes biopolímeros sobre as propriedades funcionais do amido (gelatinização e retrogradação). Como objetivos mais específicos refiram-se:

- 1) O isolamento e caracterização dos amidos (análises físico-químicas, difração de raios-X, microscopia eletrónica de varrimento (MEV), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), espectroscopia de infravermelho (MID-IR) associada à quimiometria, análise térmica e ensaios reológicos oscilatórios a baixa amplitude de deformação);
- 2) A manipulação das propriedades funcionais de sistemas de amido em dispersão aquosa através da adição de um polissacarídeo catiónico, a quitosana (ensaios reológicos oscilatórios a baixa amplitude de deformação, microscopia, espectroscopia de infravermelho e análise térmica);
- 3) O mencionado em (2) através da adição de polissacarídeos neutros (galactomananas).







## ***Capítulo 1* - Revisão Bibliográfica**

---



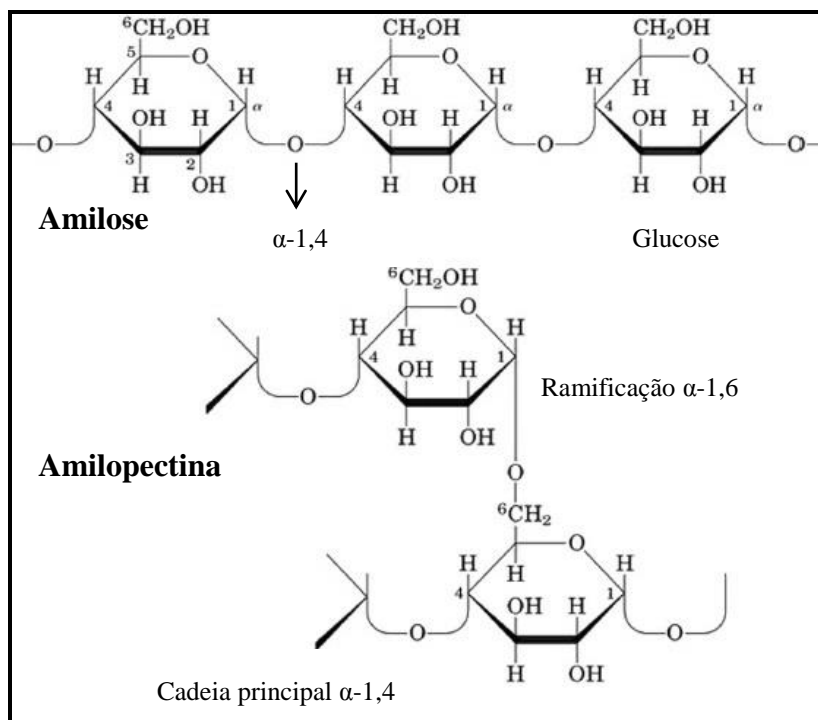
## **1.1 AMIDO E SUA IMPORTÂNCIA**

### **1.1.1 O Amido**

O amido é um polímero natural, disponível em abundância na natureza e extraído principalmente de raízes (ex.: mandioca), tubérculos (ex.: batata), leguminosas (ex.: feijão, ervilha) e cereais (ex.: milho, trigo, arroz) (Karim *et al.*, 2000; Hoover, 2001; White, 2001; Cereda *et al.*, 2002; Copeland *et al.*, 2009). Os grãos de cereais são as fontes comerciais mais importantes de amido e o milho (*Zea mays* L.) destaca-se mundialmente neste aspecto (White, 2001). Nos cereais a proporção de amido no grão geralmente representa entre 60 a 75% da sua constituição (Collado e Corke, 2003).

A biossíntese do amido ocorre no interior dos cloroplastos e amiloplastos onde se encontram as enzimas que catalisam a síntese de polímeros utilizando como material básico a glucose produzida na fotossíntese (Cereda *et al.*, 2002). Este biopolímero fornece energia para o desenvolvimento das plantas, para os animais e também para o ser humano. Na dieta humana o amido contribui com 50 a 70% da energia proporcionando uma fonte direta de glucose, substrato essencial para o cérebro, para as células vermelhas do sangue e para a geração de energia metabólica (Copeland *et al.*, 2009). Encontra-se na forma de grânulos (insolúveis em água) os quais variam em tamanho e forma, composição química, organização e características físicas, de acordo com a origem botânica (Oates, 1997; Parker e Ring, 2001; Singh *et al.*, 2003), o que lhe confere diferentes propriedades funcionais (Collado e Corke, 2003).

Formado por resíduos de  $\alpha$ -D-glucose, unidos através de ligações glucosídicas (White, 2001; Bertoft, 2004; Tester *et al.*, 2004; Copeland *et al.*, 2009), o amido apresenta a fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , na qual “n” representa o número de unidades de D-glucose que constituem a molécula (Zobel, 1992). É composto por dois polímeros estruturalmente diferentes, nomeadamente, a amilose e a amilopectina (Hoover, 2001; Collado e Corke, 2003; Bertoft, 2004; Copeland *et al.*, 2009). A estrutura química de ambos é apresentada na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Representação da estrutura química da amilose e da amilopectina.

A proporção destes polímeros no amido varia de acordo com a origem botânica, entre variedades da mesma espécie e, ainda, numa mesma variedade, o que depende do nível de maturação da planta. Possuem elevada massa molecular e a capacidade hidrofílica é determinada pela presença de grupos OH fortemente polares (White, 2001; Tester *et al.*, 2004).

A amilose é uma molécula linear e longa formada por unidades de D-glucose unidas por ligações glucosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. A amilose também pode apresentar um ínfimo grau de ramificações (White, 2001; Collado e Corke, 2003; Zobel, 1992; Bertoft, 2004; Tester *et al.*, 2004). Estas ramificações são tão poucas e longas que atuam similarmente como uma molécula não ramificada (Collado e Corke, 2003).

A média da sua massa molecular é entre  $10^5$  e  $10^6$  e a estrutura química linear da amilose permite mudanças na sua conformação. A conformação helicoidal é comum para a amilose, assim como a formação de duplas hélices quando diferentes hélices se encaixam (Collado e Corke, 2003). O interior das hélices é lipofílico com predomínio de átomos de hidrogénio e na parte externa permanecem os grupos hidroxilo (Cereda *et al.*, 2002).

O teor de amilose nos amidos normais de cereais apresenta um valor aproximado entre 20 e 35%. Porém, existem variações conhecidas como amidos cerosos ou “waxy” que possuem menos de 15% de amilose ou ainda os amidos com alto teor de amilose ou “high amylose” que contêm mais de 40% deste polímero (Bertoft, 2004; Tester *et al.*, 2004). Para além da origem botânica e do nível de maturação da planta (anteriormente citados) o conteúdo de amilose nos grânulos de amido também é influenciado pelas condições climáticas e pelo tipo de solo no qual o cultivo é realizado (Singh *et al.*, 2003).

A amilopectina é uma molécula ramificada, também formada por unidades lineares de D-glucose unidas em  $\alpha$ -1,4, porém mais curtas, e possui em média 5% de ligações em  $\alpha$ -1,6 (ramificações no carbono 6) o que resulta em um polímero ramificado (White, 2001; Zobel, 1992; Bertoft, 2004). É o componente presente em maior quantidade no amido visto que normalmente representa cerca de 75 a 80% do grânulo (Tester *et al.*, 2004). Apresenta massa molecular média de pelo menos  $10^8$  e é menos propensa à gelificação, retrogradação e sinérese devido a sua estrutura ramificada (Collado e Corke, 2003). As cadeias de amilopectina formam duplas hélices que são mantidas através de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo e podem se formar entre ramificações adjacentes do mesmo grupo de ramificações ou entre grupos em três dimensões (Oates, 1997; Hoover, 2001; Cereda *et al.*, 2002). Em termos estruturais pode-se dizer que a amilopectina é a fração de amido mais importante sendo que sozinha é capaz de formar o grânulo conforme ocorre em amidos mutantes que não apresentam amilose (Oates, 1997).

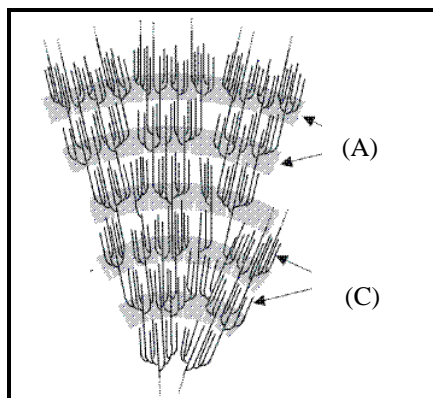
Para além da amilose e da amilopectina, apesar de controversa, alguns autores defendem a existência de um chamado material intermediário no amido. Este material está correlacionado às frações com tamanhos distintos dos encontrados na amilose e amilopectina (ex.: cadeias lineares de amilose muito curtas ou longas cadeias de amilopectina) (Bertoft, 2004). Este é dito estar presente quer em amido de milho normal quer em outros amidos (White, 2001; Bertoft, 2004) como o amido de ervilha, amido de milho com alto teor de amilose e especialmente em amido de aveia (Tester *et al.*, 2004; Bertoft, 2004) para além de amido de trigo, amido de arroz, amido de cevada e amido de batata (Bertoft, 2004). Através de análises por afinidade ao iodo é sugerido que o amido de milho apresente entre 5 a 7% deste material (White, 2001). Porém, o conceito de material

intermediário gera controvérsias devido às dificuldades na caracterização exata das cadeias de amilose e amilopectina, sendo que o principal critério para sua classificação envolve o grau de ramificação e a massa molecular (Denardin e Silva, 2009).

Assim como a funcionalidade, a organização estrutural do amido dentro do grânulo também está ligada à amilose e à amilopectina. Os grânulos de amido são semicristalinos, ou seja, apresentam regiões cristalinas ordenadas e amorfas menos ordenadas (Singh *et al.*, 2003; Collado e Corke, 2003; Liu *et al.*, 2009a). As macromoléculas lineares e ramificadas do amido estão arranjadas na direção radial formando ligações de hidrogênio. Quando observados, em solução aquosa, sob luz polarizada os grânulos são birrefringentes e apresentam uma cruz de polarização, conhecida como Cruz de Malta que é observada devido à refração das regiões cristalinas (Cereda *et al.*, 2002; Collado e Corke, 2003; Denardin e Silva, 2009). A propriedade de birrefringência está associada ao alto grau de ordenação molecular interna (Denardin e Silva, 2009). A amilopectina é o componente exclusivamente associado à cristalinidade enquanto a amilose é a principal responsável pelas regiões amorfas (Oates, 1997; Singh *et al.*, 2003; Tester *et al.*, 2004). Esta associação provém da observação de que em alguns amidos ricos em amilose não se observa a birrefringência, ao contrário dos amidos cerosos e normais, relacionando-se desta forma a cristalinidade principalmente à presença da amilopectina (Cereda *et al.*, 2002). Liu *et al.* (2009a) ressaltam que a amilose e os pontos de ramificação da amilopectina formam a região amorfa e as cadeias de ramificação curtas da amilopectina são o principal componente cristalino no grânulo de amido, principalmente em função das duplas hélices formadas pelas ramificações deste polímero (Hoover, 2001).

Diversas camadas compõem o grânulo de amido as quais se superpõem ao redor de um ponto denominado hilo (central ou deslocado lateralmente), que é considerado o ponto original de crescimento do grânulo. A existência destas camadas sugere a deposição do amido em um ritmo diário e desta maneira o material recentemente sintetizado deposita-se na superfície e ocasiona o crescimento do grânulo. Duas zonas cristalinas são separadas por uma zona amorfa (Figura 1.2) sendo que as regiões cristalinas são mais densas e ordenadas ao contrário das regiões amorfas o que torna estas mais suscetíveis à entrada de água, enzimas e ao ataque de ácidos. A organização das camadas de crescimento alternadas

em regiões cristalinas e amorfas é a razão pela qual o amido é um polímero semicristalino e a rutura desta estrutura organizada é o fundamento para a gelatinização (Cereda *et al.*, 2002; Denardin e Silva, 2009), propriedade do amido que será posteriormente descrita.



**Figura 1.2:** Representação das regiões cristalinas (C) e amorfas (A) dos grânulos de amido (Denardin e Silva, 2009).

Devido a esta parcial cristalinidade, através da análise de difração de raios-X são identificados padrões característicos dos amidos em consequência do empacotamento (conformação) em duplas hélices das cadeias ramificadas da amilopectina (mantidas por ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo). Os padrões de cristalinidade dos amidos variam de acordo com a fonte e se apresentam em três formas ou arranjos principais sendo conhecidos como padrões A, B e C. O tipo A é característico dos amidos de cereais (amilopectina com cadeias mais curtas), o tipo B é característico de amidos de tubérculos, frutas, milho com alto teor de amilose e amidos retrogradados (Karim *et al.*, 2000; Cereda *et al.*, 2002; Tester *et al.*, 2004; Copeland *et al.*, 2009). As formas cristalinas A e B são essencialmente parecidas, mas o empacotamento da estrutura cristalina do tipo A é mais compacta que a B (Tester *et al.*, 2004; Copeland *et al.*, 2009). O tipo C é conhecido como uma mistura dos tipos A e B e caracteriza as leguminosas (Karim *et al.*, 2000; Cereda *et al.*, 2002; Copeland *et al.*, 2009). A organização das duplas hélices (configuração de empacotamento) é que diferencia os tipos cristalinos (Cereda *et al.*, 2002) e é influenciada pelo conteúdo de água presente (Denardin e Silva, 2009). Também é conhecido outro padrão, o tipo V visualizado quando o amido é gelatinizado, apresentando baixa cristalinidade (também observado na presença de complexos com a amilose) (Karim *et al.*, 2000).

### **1.1.2 Propriedades Funcionais do Amido (gelatinização e retrogradação)**

As propriedades funcionais representam as características que gerem o comportamento de um produto alimentar durante o processamento e armazenamento. Em seu sentido lato, funcionalidade é qualquer propriedade do componente alimentar, para além do seu valor nutricional, que afeta a sua utilização, intimamente relacionada com as propriedades físico-químicas do produto (Collado e Corke, 2003).

Quando é preparada uma suspensão de amido em meio aquoso, à temperatura ambiente, os grânulos incham devido à absorção da água que penetra com maior facilidade nas regiões amorfas. A presença da água dentro dos grânulos resulta no aumento do seu volume em torno de 30%, sendo este processo reversível (White, 2001). No entanto, quando os grânulos de amido estão em presença de água e simultaneamente sob aplicação de calor ocorrem mudanças irreversíveis ao alcançarem uma determinada temperatura. Estas mudanças irreversíveis são conhecidas como gelatinização do amido que é definida pela perda da sua ordem estrutural devido ao aumento da temperatura em meio aquoso (perda da birrefringência) (Hoover, 2001; White, 2001; Collado e Corke, 2003; Singh *et al.*, 2003; Copeland *et al.*, 2009).

A temperatura que marca o início destas transformações no grânulo é influenciada por vários fatores (ex.: tipo de amido, composição, estrutura, hidratação) e é denominada como temperatura de gelatinização. A partir deste ponto, o aumento da temperatura resulta na rutura das ligações de hidrogénio existentes dentro dos grânulos, inicialmente nas regiões amorfas onde as ligações são mais fracas (Singh *et al.*, 2003) facilitando a entrada da água e, conseqüentemente ocorre o inchamento dos grânulos em grande proporção. Nesta parte do processo também ocorre à lixiviação dos componentes do amido para fora do grânulo (principalmente da amilose e maior hidratação da amilopectina) e resulta no aumento da viscosidade (White, 2001). A gelatinização é um processo complexo que envolve várias fases iniciando com o inchamento dos grânulos, perda da ordem estrutural, rutura da estrutura e solubilização do amido. No fim do processo de gelatinização forma-se uma estrutura em rede que envolve as cadeias de amilose e de amilopectina unidas à água através de ligações de hidrogénio (White, 2001; Collado e Corke, 2003).



Durante o processo de gelatinização, o grau de inchamento e desintegração do grânulo, bem como a lixiviação dos seus componentes do interior dos grânulos depende de fatores como, por exemplo, o tipo de amido, a sua concentração, temperatura utilizada neste processo, pH, agitação aplicada durante o aquecimento, composição, além da presença de outros solutos (lípidos, sal, açúcares, proteínas e outros biopolímeros) (Appelqvist e Debet, 1997). Nem todos os grânulos iniciam o processo de gelatinização exatamente à mesma temperatura e, como referido, as temperaturas de gelatinização variam conforme a fonte botânica do amido. Por isto são conhecidas faixas de temperaturas nas quais diferentes amidos gelatinizam. Para cereais como o milho e trigo encontram-se faixas que podem variar entre 62 e 70 °C e entre 59.5 e 64 °C, respetivamente, ao passo que os amidos de tubérculos e raízes apresentam temperaturas de gelatinização um pouco mais baixas que os cereais, geralmente com variação numa faixa entre 58 e 66 °C na batata e entre 52 e 64 °C na mandioca (Cereda *et al.*, 2002).

Em muitas operações de processamento de alimentos a gelatinização do amido é de grande importância. Processos como, por exemplo, a fabricação de produtos de panificação, gelificação de recheios para doces, produção de massas, espessamento de molhos e a fabricação em geral de produtos à base de amido são dependentes da adequada gelatinização do amido para produzir a textura desejada (Appelqvist e Debet, 1997).

Após o processo de gelatinização, o comportamento dos amidos gelatinizados durante o arrefecimento e armazenamento é conhecido como retrogradação (Karim *et al.*, 2000). A retrogradação do amido também apresenta grande importância, pois tem influencia na textura, na qualidade, na aceitabilidade e no tempo de prateleira dos produtos que contém amido na sua composição. Consiste em um processo que ocorre quando as moléculas do amido gelatinizado começam a se reassociar através de ligações de hidrogénio em uma estrutura mais ordenada (Ward *et al.*, 1994; Karim *et al.*, 2000; White, 2001).

Durante o armazenamento do amido gelatinizado, as cadeias de amido apresentam uma tendência de interagir entre si e desta maneira acabam por libertar as moléculas de água as quais estavam ligadas. Esta libertação de água, designada sinérese, é um processo

geralmente indesejável e que ocorre principalmente durante o armazenamento de produtos a baixas temperaturas (Karim *et al.*, 2000).

É aceite que quer a amilose quer a amilopectina estão envolvidas na retrogradação do amido, embora envolvendo cinéticas de recristalização diferentes, sendo rápida para a amilose e mais lenta para a amilopectina (podendo ocorrer durante vários dias ou semanas) (Chang e Liu, 1991 *apud* Goñio *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 1994; Eliasson, 1985; Eliasson e Ljunger, 1988; Russel, 1983, 1987 *apud* Karim *et al.*, 2000). A amilose apresenta forte tendência em se reassociar enquanto a amilopectina retrograda em uma proporção menor, porém, durante um período de tempo mais longo (Parker e Ring, 2001). Esta diferença na reassociação das cadeias está ligada às estruturas químicas lineares e ramificadas que formam a amilose e a amilopectina, respetivamente. A linearidade da amilose facilita a sua reassociação e forma cristais mais estáveis. Já as ramificações presentes na amilopectina são responsáveis pela menor e mais lenta reorganização molecular. Em suma, a retrogradação é um processo de bastante complexidade no qual as cadeias de amilose que foram solubilizadas durante a gelatinização se reassociam com outras cadeias de amilose adjacentes e formam duplas hélices cristalinas (estabilizadas por ligações de hidrogénio). No decorrer do arrefecimento, estas hélices se agregam e formam estruturas cristalinas tridimensionais e estáveis (Karim *et al.*, 2000).

Assim como no processo de gelatinização, a retrogradação é influenciada por vários fatores tais como o tipo e concentração de amido, proporção de amilose e amilopectina, temperatura de armazenamento, pH e a presença de outros componentes (Appelqvist e Debet, 1997).

### **1.1.3 Usos do Amido na Indústria**

São inúmeros os produtos originários da industrialização de amidos, os quais são destinados às mais diversas utilizações. Estes produtos abrangem áreas como a alimentar, a indústria de papel, têxtil, química e farmacêutica. A grande aplicabilidade que os amidos apresentam é um ponto forte para sua comercialização.

No ramo alimentar nenhum outro ingrediente se compara ao amido em termos de versatilidade de aplicação. É utilizado como ingrediente básico em uma ampla gama de produtos devido às suas propriedades e também ao seu baixo custo como matéria-prima. Tem grande influencia na aparência e textura dos produtos em que é utilizado sendo o espessante e gelificante mais comum na indústria de alimentos (Singh *et al.*, 2003). Nesta indústria, possui vasto uso como agente ligante na produção de embutidos (produtos cárneos), como retentor de água, substituto de gordura, usado em produtos de padaria em geral, confeitaria, no encapsulamento de sabor, emulsões de bebidas, produtos lácteos, preparados de frutas, molhos, sopas desidratadas, na produção de maionese, na composição de embalagens, produção de salgadinhos, entre outros (Taggart, 2004).

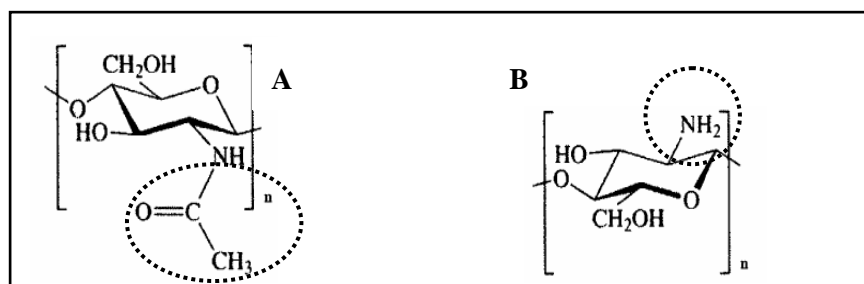
As propriedades funcionais relevantes de cada amido estão diretamente ligadas à aplicação final do mesmo. Como por exemplo, o amido de milho normal frequentemente é utilizado em sopas desidratadas e em produtos que requerem viscosidade quando aquecidos, como os molhos (Weber *et al.*, 2009). Atualmente pode-se dizer que a demanda por alimentos prontos e refrigerados abrange uma boa parte do mercado. Estes produtos, até chegarem ao consumidor, acabam por passar por diferentes ciclos de temperatura durante a sua comercialização, o que acarreta alterações na textura e por consequência na perda de qualidade. Quer os amidos nativos, quer os que contêm alto teor de amilose na sua composição, apresentam uma forte tendência em sofrer o processo de retrogradação quando armazenados no frio. Por isto estes amidos são menos indicados para produtos que exigem refrigeração. Já os amidos com alto teor de amilopectina são mais indicados para este tipo de aplicação (White, 2001), pois apresentam maior estabilidade sob baixas temperaturas.

Neste trabalho, para além do amido, foram também utilizados outros biopolímeros nomeadamente a quitosana e as galactomananas (goma guar, goma de alfarroba e goma cassia). Referem-se, de seguida, algumas características relevantes destes polissacarídeos.

## 1.2 QUITOSANA

Entre os polímeros naturais, a quitosana destaca-se devido à presença de grupos amina que conferem a este polissacarídeo características diferenciadas e uma variedade de aplicações (Damian *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011). É produzida a partir da desacetilação da quitina (por tratamento com NaOH e aquecimento) a qual tem como fonte tradicional os exoesqueletos de crustáceos, principalmente quando destinada ao uso pela indústria de alimentos (Kumar, 2000; Damian *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007; Pillai *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011).

A quitina apresenta uma estrutura semelhante à celulose na qual os grupos hidroxilo em C-2 foram substituídos por grupos acetamida (Pillai *et al.*, 2009). Quando a quitina apresenta um grau de desacetilação igual ou superior a 50%, ou seja, quando ocorre a conversão de 50% dos grupos acetilo para grupos amino livres (Figura 1.3), ela torna-se solúvel em meio ácido e então é chamada de quitosana (Rinaudo, 2006). A celulose é o polímero de maior disponibilidade na natureza (seguido pela quitina) porém, é menos versátil que a quitosana justamente pela diferente estrutura química, solubilidade e bioatividade (Damian *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011). A quitosana apresenta estrutura linear com a fórmula química condensada  $(C_6H_{11}O_4N)_n$  e da mesma maneira que a quitina possui estrutura composta por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4). No entanto, a quitina apresenta predominância em unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose enquanto a quitosana em unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (Damian *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007; Dash *et al.*, 2011).



**Figura 1.3:** A: Monómero da quitina (destaque ao grupo acetilo). B: Monómero da quitosana (destaque ao grupo amino) (Rinaudo, 2006).

O grau de acetilação é responsável pelo controlo de muitas propriedades físico-químicas deste polímero (Damian *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009), tais como a solubilidade, o pKa e a viscosidade (Santos *et al.*, 2009; Alvarenga *et al.*, 2010). É influenciado pela concentração de NaOH utilizada para a desacetilação, pela temperatura e pelo tempo de reação, fatores que também afetam a massa molecular (Damian *et al.*, 2005).

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos como o ácido acético (mais usual), fórmico e cítrico, assim como em ácidos inorgânicos diluídos tais como o ácido clorídrico, nítrico e perclórico, resultando em soluções viscosas. Em meio ácido ocorre a protonação dos grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ) o que confere o caráter polieletrólítico catiónico relacionado com as suas propriedades particulares, as quais a distinguem de muitos outros polissacarídeos (Kumar, 2000; Okuyama *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2009). Quanto mais grupos amino ou seja quanto maior o grau de desacetilação, maior será a sua solubilidade (o aumento destes grupos aumenta o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias resultando em maior solvatação em meio aquoso) (Rinaudo *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009). Em soluções que apresentam pH acima de 6 os grupos amino da quitosana são desprotonados tornando-a insolúvel e, portanto, ocorre a sua precipitação (Pillai *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011).

Como principais propriedades da quitosana podem-se citar a sua bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, capacidade de formar filmes, habilidade de quelação e capacidade adsortiva (Kumar, 2000; Rinaudo, 2006; Aider, 2010), para além de ser renovável e não tóxica. Estas características conferem-lhe aplicações nas mais variadas áreas como a biomédica (possui propriedades curativas de feridas, é eficiente contra bactérias, vírus e fungos), a agrícola (ex.: defesa e crescimento de plantas), no tratamento de água (ex.: clarificador, removedor de íons metálicos), na cosmética (tratamento da pele, cabelo e cuidados bucais) na farmacêutica (imunológico, antitumoral, anticoagulante, antibactericida) (Kumar, 2000; Rinaudo, 2006; Azevedo *et al.*, 2007), na indústria têxtil (Kumar, 2000; Kong *et al.*, 2010) e de papel (Kumar, 2000), entre outras. Na indústria alimentar é utilizada quer em alimentos quer em bebidas podendo-se citar sua atuação como fibra dietética (não digerível), ligante de lípidos (reduz colesterol), agente de

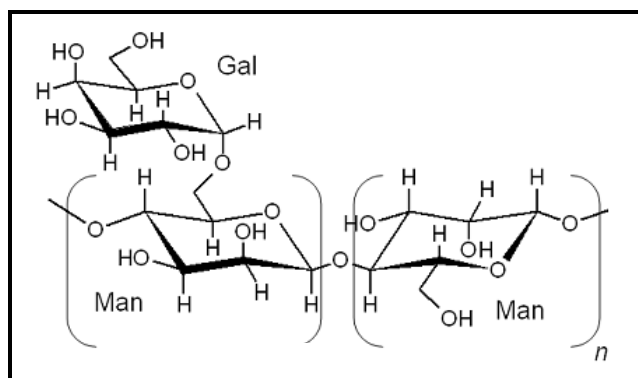
conservação (revestimentos para frutas e outros alimentos) para além de aplicações como espessante e estabilizante em molhos (Rinaudo, 2006; Azevedo *et al.*, 2007).

Por ser um material com grande potencial e pela possibilidade de modificações estruturais para obtenção de propriedades e funções desejáveis, a quitosana é alvo de pesquisas a nível mundial e tornou-se de grande interesse, não apenas pelo facto de ser uma matéria-prima renovável, mas por ser um biomaterial funcional com grandes perspectivas em várias áreas (Pillai *et al.*, 2009; Aider, 2010).

### **1.3 GALACTOMANANAS**

As galactomananas são biopolímeros neutros, comumente extraídos do endosperma de sementes de várias plantas, que pertencem particularmente ao género *Leguminosae*, onde possuem a função de reserva de materiais utilizados durante a germinação (Lapasin e Princl, 1995; Sierakowski *et al.*, 2000; Coimbra *et al.*, 2004, Prajapati *et al.*, 2013a, Prajapati *et al.*, 2013b). Também são extraídas de outras fontes como fungos, bactérias e algas.

São compostas por uma cadeia principal linear formada por unidades monossacarídicas de  $\beta$ -1,4-D-manose substituídas na posição 6 por unidades monossacarídicas de  $\alpha$ -1,6-D-galactose (Figura 1.4) (Sierakowski *et al.*, 2000), em graus variáveis dependendo da espécie de onde são extraídas, sendo que a razão manose/galactose é o principal fator que as diferencia (Prajapati *et al.*, 2013b). Por serem extraídas de diversas fontes diferem na massa molecular e na sua distribuição para além da mencionada razão entre as frações de manose e galactose (M/G) (Lapasin e Princl, 1995) que pode variar entre 10 e 1. Este fator determina a solubilidade em água e a viscosidade das soluções aquosas (Coimbra *et al.*, 2004) e quanto mais galactose na estrutura maior a sua solubilidade (Prajapati *et al.*, 2013b). As maiores fontes de galactomananas são a goma guar, a de alfarroba, a tara e a fenugreek, sendo que a guar e a de alfarroba apresentam maior importância industrial (Prajapati *et al.*, 2013b).



**Figura 1.4:** Representação da estrutura das galactomananas (Prajapati *et al.*, 2013b).

A grande vantagem da utilização das galactomananas é a capacidade de formar soluções muito viscosas a concentrações relativamente baixas (Coimbra *et al.*, 2004; Prajapati *et al.*, 2013b) sendo consideradas como bons espessantes. São pouco influenciadas pelo pH, força iónica e tratamento térmico, além de formarem facilmente ligações de hidrogénio (Prajapati *et al.*, 2013b). Quando comparadas economicamente com outros polissacarídeos como, por exemplo, a goma xantana apresentam vantagem pelo baixo custo.

São conhecidas por interagir com outros polissacarídeos e são utilizadas na modificação de textura de alimentos, melhorando a capacidade de retenção de água e agindo como emulsificantes e estabilizantes. Para além destas funções nos produtos alimentares são também uma importante fonte de fibra dietética, que podem apresentar atividade a nível biológico como, por exemplo, na redução da ingestão de calorias e no controlo do colesterol (Prajapati *et al.*, 2013b).

A interação das galactomananas com outros polissacarídeos tem sido um assunto atrativo no campo da pesquisa e na busca cada vez maior da indústria alimentar, por melhorar ou originar novas formulações. Os sistemas mistos com o amido receberam bastante atenção verificando-se mudanças no comportamento reológico e térmico do amido devido à interação sinérgica destes biopolímeros (Allonce *et al.*, 1989; Sudhakar *et al.*, 1996; Closs *et al.*, 1999; Mali *et al.*, 2003; Chaisawang e Supphantharika, 2005; Kaur *et al.*, 2008; Šubarić *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Goma Guar

A goma guar é conhecida como a fonte comercial de galactomananas mais utilizada com um consumo entre 70 a 80 mil toneladas por ano. É cultivada principalmente na Índia e Paquistão e em menor extensão em áreas tropicais como América do Sul e Central, Austrália e em regiões semiáridas dos Estados Unidos (Prajapati *et al.*, 2013b). É extraída do endosperma das sementes da leguminosa *Cyamopsis tetragonolobus* e possui uma razão de M/G em redor de 2:1 (Lapasin e Princel, 1995; Toneli *et al.*, 2005; Prajapati *et al.*, 2013b) e a massa molecular varia de acordo com o crescimento e fatores de manufaturação (Prajapati *et al.*, 2013b) entre aproximadamente  $0.5 \times 10^6$  a  $11 \times 10^6$  (Lapasin e Princel, 1995; Toneli *et al.*, 2005). Está entre as galactomananas mais substituídas e, portanto, é das mais solúveis devido à significativa hidratação das regiões ricas em galactose (Prajapati *et al.*, 2013b).

### 1.3.2 Goma de Alfarroba

A goma de alfarroba é a segunda galactomanana mais utilizada (12 a 14 mil toneladas por ano) (Prajapati *et al.*, 2013b). É cultivada nos países Mediterrânicos e em determinadas regiões da América do Norte. É extraída das sementes da alfarrobeira, *Ceratonia siliqua*, possui uma razão de M/G em redor de 4:1 e massa molecular média igualmente variada, geralmente na faixa de  $3 \times 10^5$  (Lapasin e Princel, 1995; Toneli *et al.*, 2005; Prajapati *et al.*, 2013a).

### 1.3.3 Goma Cassia

A goma cassia é menos conhecida e explorada na escala industrial do que a goma guar e a de alfarroba. Encontrada na Índia, a baixo custo, é extraída do endosperma de sementes da *Cassia tora* e *Cassia obtusifolia*. Apresenta razão de M/G de 5:1 e massa molecular entre  $2 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  (EFSA, 2006; Kaur *et al.*, 2008). No Japão esta goma já é utilizada há bastante tempo como aditivo alimentar e desde 2006 foi considerada pela *European Food Safety Authority* como não sendo uma preocupação a nível de segurança e que o seu uso está em concordância com as especificações de aditivo para uso alimentar, o



que despertou o interesse para a sua maior utilização (EFSA, 2006; Kaur *et al.*, 2008). A goma cassia pode ser considerada como um novo e interessante agente espessante para muitas aplicações alimentares (Kaur *et al.*, 2008).

## **1.4 INTERAÇÕES ENTRE O AMIDO E OUTROS POLISSACARÍDEOS**

Os polissacarídeos são biopolímeros versáteis, disponíveis na natureza sob diversas formas e que exercem diferentes funções. Estas características fazem com que estas matérias-primas renováveis tenham grande aplicabilidade na indústria de alimentos. A sua utilização mais frequente está associada à capacidade de espessar e gelificar soluções, sendo aplicados na melhoria e padronização da qualidade dos alimentos processados (Lapasin e Prich, 1995). Frequentemente a designação hidrocolóide é utilizada para se referir estes materiais (Lopes da Silva *et al.*, 2004) devido às propriedades hidrofílicas e grande interação com água, o que origina, associada à sua elevada massa molecular, as propriedades espessantes e/ou gelificantes em condições específicas.

Como já referido, o amido está entre os polissacarídeos mais importantes e utilizados na indústria de alimentos, cujas características podem ser influenciadas quando, por exemplo, determinado polissacarídeo não-amiláceo é utilizado em conjunto com o amido (como a celulose, pectinas, galactomananas, quitosana, goma xantana e gelana, inulina, entre outros).

Vários estudos têm sido conduzidos com a intenção de compreender porquê a adição de pequenas quantidades de hidrocolóides influencia as propriedades do amido, conforme mostram trabalhos de revisão já publicados (Appelqvist e Debet, 1996; Funami, 2009; BeMiller, 2011). Esta linha de pesquisa é vasta em função da importância comercial dos produtos alimentícios industrializados que contêm amido e do papel determinante na textura e estabilidade destes produtos. Combinações de amido com outros hidrocolóides têm sido utilizadas pelo menos desde 1950. As razões para as combinações destes ingredientes variam de acordo com o produto em questão, embora o objetivo geral seja a melhoria das propriedades dos amidos nativos (BeMiller, 2011). Nestes casos, muitas

vezes, são utilizadas modificações químicas para melhorar a tolerância a certas condições de processamento, para alcançar a textura desejada, melhorar a estabilidade em condições de armazenamento entre outros atributos esperados. A utilização de sistemas mistos pode ajudar a suprir estas deficiências que os amidos nativos sozinhos possam apresentar e fornecem um “rótulo limpo”, ou seja, ajudam a evitar o uso de um ingrediente quimicamente modificado.

Misturas de polissacarídeos nas formulações de alimentos podem ter como resultados finais interações sinérgicas desejáveis, ocasionando melhoramento das propriedades reológicas e da qualidade dos produtos. A combinação de polissacarídeos também pode ser benéfica no sentido de que existe um potencial na redução de custo de produção quando se utilizam estas misturas (Williams e Phillips, 1995).

De acordo com Williams e Phillips (1995) existem três tipos de interações que podem ocorrer em soluções com dois ou mais polímeros, dependendo da natureza dos mesmos:

- Incompatibilidade: resulta na formação de duas fases líquidas, com cada uma delas enriquecida em um ou outro polímero. (A maioria dos polímeros é incompatível, devido às diferenças nas contribuições entrópicas e entálpicas. Acima de certa concentração dos polímeros estes se separam);
- Compatibilidade: resulta em miscibilidade completa e na formação de uma única fase homogênea. (A completa miscibilidade é difícil de ocorrer sendo possível, em particular, quando um dos polímeros possui carga);
- Associação de polímeros: resulta na coprecipitação dos polímeros na forma de um coacervado sólido ou, em alguns casos, na formação de um gel. (A coacervação ou precipitação ocorre quando as moléculas dos polímeros se associam como através de associações eletrostáticas em mistura de polímeros com cargas opostas).

São muitas as variáveis utilizadas na investigação deste assunto as quais incluem

diferentes fontes de amido, diferentes hidrocolóides adicionados às misturas e a utilização de técnicas ou parâmetros distintos de análise. Recentemente BeMiller (2011) realizou uma revisão englobando 267 referências sobre combinações amido-hidrocolóides direcionadas para a indústria de alimentos. De acordo com o autor, em comparação com o amido sozinho, a maioria das pastas ou géis resultantes de combinações obteve um aumento da viscosidade final, aumento da retrogradação a curto prazo e aumento da força do gel, diminuição no inchamento dos grânulos, diminuição na lixiviação dos polímeros de amido dos grânulos intumescidos e diminuição da retrogradação a longo prazo (no entanto, efeitos opostos a estes também foram observados). A maioria dos resultados já descritos apontam para que possam ocorrer diversos mecanismos, entre os quais a interação entre as moléculas dos hidrocolóides e os polímeros de amido lixiviados (em alguns casos aumentam e em outros decrescem ou enfraquecem a formação da rede formada pelos polímeros do amido), a alteração do grau de inchamento dos grânulos, a associação com os grânulos inchados e a separação de fases entre a amilose, amilopectina e as moléculas dos hidrocolóides na fase contínua. A conclusão geral é de que devido à complexidade da variação dos sistemas mistos, diversos mecanismos são suscetíveis de ocorrer e variam de acordo com a matéria-prima e também com fatores como os métodos de preparação.

## **1.5 REVISÃO DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO**

Na sequência é apresentado um breve resumo das principais técnicas utilizadas neste trabalho para melhor possibilitar a compreensão dos resultados e do porquê da escolha e utilização das mesmas.

### **1.5.1 Reologia**

A reologia é a análise comportamental de como os materiais respondem à aplicação de uma força ou à deformação. Todos os materiais se deformam e respondem de maneira diferenciada às forças externas a que são submetidos (Steffe, 1996). Por definição é a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos materiais. Esta definição é aceite desde 1929 quando foi fundada a Sociedade Americana de Reologia (Kavanagh e Ross-

Murphy, 1998).

Neste contexto, todos os materiais apresentam propriedades reológicas de modo que esta ciência é aplicada nas mais diferentes áreas (Toneli *et al.*, 2005). Na ciência alimentar o estudo da reologia está correlacionado com o desenvolvimento e melhoramento de produtos e pode orientar a produção industrial, com efeito direto sobre os consumidores no que respeita, por exemplo, à percepção oral (Fischer e Windhab, 2011). Cada vez mais os consumidores desejam alimentos que tragam benefício à saúde sem abrir mão da qualidade sensorial. A qualidade do alimento, a percepção de diferentes texturas e a reologia estão intimamente ligadas, podendo-se dizer que esta avaliação é indispensável (Toneli *et al.*, 2005).

De acordo com Steffe (1996) o conhecimento dos dados reológicos é essencial para a indústria de alimentos no que diz respeito aos cálculos em engenharias de processos (abrangendo equipamentos como bombas, tubulações, extrusores, misturadores, trocadores de calor), determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos, controlo da qualidade, testes de tempo de prateleira e também na avaliação da textura e relação com testes sensoriais dos alimentos.

De uma maneira geral, na teoria reológica, os materiais são divididos em sólidos ideais e líquidos ideais (no primeiro caso a energia de deformação é recuperada ao remover a tensão aplicada e no segundo a energia é dissipada). Pode-se dizer que uma das diferenças básicas entre sólidos e líquidos, sob tensão de deformação, é que os materiais sólidos são elasticamente deformados ao passo que os líquidos escoam. Nos materiais sólidos a propriedade de maior interesse é a elasticidade e nos líquidos a viscosidade. No entanto, nenhum material possui o comportamento reológico de ser idealmente elástico ou idealmente viscoso. Para exemplificar pode-se citar o aço, um sólido típico, que pode ser forçado a fluir quando pressionado em um molde, bastando a aplicação de uma força com magnitude suficiente para esta ação (Schramm, 2006). Materiais reais comportam-se como sólidos e líquidos e este comportamento mediano é designado como viscoelástico (Lopes da Silva *et al.*, 2004; Schramm, 2006). Assim, para um material viscoelástico uma parte da tensão aplicada pode ser parcialmente recuperada devido às propriedades elásticas,

enquanto parte desta é dissipada devido às propriedades viscosas.

As propriedades viscoelásticas de sólidos, semisólidos e líquidos são medidas em equipamentos denominados reômetros (Karim *et al.*, 2000). Os viscosímetros são equipamentos também conhecidos nesta área, porém, limitam-se apenas à medida de viscosidade. A análise das propriedades viscoelásticas auxilia a compreensão da estrutura molecular, fornece parâmetros para modificá-la e adequá-la às exigências de utilização (Schramm, 2006).

As medidas reológicas podem envolver forças de grande ou pequena deformação (ensaios estacionários ou dinâmicos). As altas tensões de deformação causam desorientação das moléculas e alteração da estrutura. Ensaios deste tipo são realizados, por exemplo, na indústria de panificação, onde são utilizados equipamentos como o farinógrafo, mixógrafo e extensiógrafo (Watanabe *et al.*, 1998). Os ensaios a baixa amplitude de deformação realizados em reômetro adequado não causam alteração da estrutura da amostra desde que realizados na zona de comportamento viscoelástico linear, ou seja, são testes que consistem em analisar a amostra de maneira não destrutiva, muito utilizados para o estudo do comportamento de géis.

Os ensaios dinâmicos relacionam a frequência escolhida com a deformação ou tensão resultante (Schramm, 2006). São realizados dentro da faixa de viscoelasticidade linear, ou seja, no intervalo onde a resposta do material a uma tensão ou deformação aplicada ocorre de forma linear sendo, portanto, realizados geralmente a baixas taxas de deformação o que permite o estudo dos efeitos das variáveis de composição e de processamento para uma maior compreensão das propriedades dos alimentos (Burey *et al.*, 2009). Num teste dinâmico ou oscilatório é aplicada uma tensão ( $\sigma$ ) ou deformação ( $\gamma$ ), sinusoidalmente a determinada frequência ( $\omega$ ), medindo-se a resultante deformação ou tensão e consequente desfasamento entre as duas variáveis.

Os parâmetros viscoelásticos de um material geralmente são representados pelo módulo elástico ou de conservação de energia ( $G'$ ) e pelo módulo viscoso ou de perda de energia ( $G''$ ). Outro parâmetro também muito utilizado na análise do comportamento

viscoelástico é a tangente de dissipação ou tangente do ângulo de perda ( $\tan \delta$ ), definido pela razão entre o módulo de perda e o de conservação ( $G''/G'$ ). O  $G'$  é a medida do caráter sólido ou das características elásticas do material e está relacionado com a energia que é armazenada durante o teste e com o desenvolvimento da estrutura da amostra e formação de ligações. O  $G''$  é a medida do caráter líquido ou das características viscosas e está relacionado com a energia dissipada ou perdida. A  $\tan \delta$  indica a contribuição quer das características elásticas quer das características viscosas da amostra em análise, ou seja, mede a energia dissipada relativamente à energia armazenada (Kavanagh e Ross-Murphy, 1998; Singh *et al.*, 2003; Lopes da Silva *et al.*, 2004; Burey *et al.*, 2009).

Nos ensaios dinâmicos realizados para avaliar a variação da estruturação do material são amplamente utilizados três tipos de testes para caracterizar o comportamento viscoelástico, por exemplo durante variações de temperatura a que o material seja sujeito ou durante processos de maturação: Varrimento em temperatura a baixa amplitude de deformação e a determinada frequência de oscilação, testes de varrimento em frequência (deformação e temperatura constantes) e testes de varrimento em tempo a determinada frequência, deformação e temperatura constante. Todos estes ensaios foram aplicados no presente trabalho.

Cabe ressaltar que para determinar as características viscoelásticas, através de taxas de pequena deformação, o primeiro passo é submeter as amostras a testes para determinar as condições não destrutivas apropriadas (varrimento de tensão aplicada) (Burey *et al.*, 2009). A região viscoelástica linear (LVR) pode ser definida como a região onde a tensão aplicada é diretamente proporcional à deformação resultante, assumindo-se então que os módulos viscoelásticos medidos são independentes da amplitude de deformação imposta (Steffe, 1996). Para a determinação do valor desta região em modo oscilatório, são normalmente aplicadas tensões crescentes a determinada frequência e temperatura, definindo-se o limite da região LVR como a deformação até à qual o módulo permanece constante (Karim *et al.*, 2000).

No caso das propriedades reológicas de sistemas de amido, quer de dispersões aquosas, pastas ou géis, estas variam de acordo com vários fatores como: fonte,

concentração, temperatura, pH, adição e ou presença de outros componentes (lípidos, proteínas, açúcares, sal, polissacarídeos, entre outros), capacidade de inchamento, teor de danificação, distribuição do tamanho, forma e estrutura granular (Singh *et al.*, 2003; Eliasson e Gudmundsson, 2006).

### **1.5.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)**

O termo DSC tem origem do inglês *Differential Scanner Calorimetric* e é uma das análises térmicas mais utilizadas em materiais poliméricos (Liu *et al.*, 2009a). Para o estudo do comportamento térmico do amido o DSC foi utilizado pela primeira vez na década de 70. Desde então é considerado o método mais adequado e utilizado para a obtenção de informações sobre os processos de gelatinização e retrogradação (quer do amido sozinho quer em sistemas mistos) bem como dos fatores que interferem nestes processos (Karim *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009a). Desta forma, a análise térmica fornece parâmetros para a determinação da funcionalidade do amido e da influência de outros compostos nestes processos.

Basicamente, a calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica em que um diferencial de energia é medido entre uma substância e um material de referência em função da temperatura, quando ambos os materiais são sujeitos a um aquecimento ou arrefecimento programado. Quando uma transição térmica ocorre, a energia absorvida ou libertada pela amostra é suprida por um aumento ou decréscimo da energia fornecida à mesma pelo calorímetro, para desta maneira manter o balanço de temperatura. Como esta energia fornecida é diretamente equivalente, em magnitude, à energia consumida na transição, um registro deste balanço de energia produz uma medição calorimétrica da transição de energia, a qual é registrada na forma de um pico. A área sob o pico é diretamente proporcional à variação de entalpia do processo (Karim *et al.*, 2000).

O DSC fornece informações qualitativas e quantitativas em função do tempo e temperatura, considerando as transições em materiais que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos, ou ainda mudanças na capacidade calorífica (Wunderlich, 2000). Através deste equipamento pode-se obter, como por exemplo, as temperaturas de

transições térmicas de amidos ( $T_o$ ,  $T_p$  e  $T_c$ ) e a variação de entalpia associada ( $\Delta H$ ) quer para o processo de gelatinização quer para o processo de retrogradação. A entalpia medida durante a gelatinização está relacionada com a organização molecular dentro do grânulo de amido, ou seja, principalmente com a amilopectina (Singh *et al.*, 2003). No processo de retrogradação sugere-se também que é esta fração de amido a principal responsável pelas alterações térmicas medidas no DSC (Karim *et al.*, 2000). Enquanto as cadeias de amilopectina recristalizadas necessitam de temperaturas abaixo de 100 °C para fundir (menos estáveis) as de amilose fundem entre aproximadamente 140 e 160 °C (Ferrero *et al.*, 1996; Karim *et al.*, 2000).

Como exemplo de algumas das vantagens que contribuíram para a ampla utilização do DSC é possível citar: a facilidade na preparação da amostra, aplicabilidade quer para sólidos quer para líquidos, tempo de análise relativamente curto e ampla faixa de temperatura (Wunderlich, 2000).

### **1.5.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)**

O microscópio eletrónico de varrimento é uma ferramenta destinada basicamente para a análise de superfície de amostras. Possui uma ótima resolução e elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional).

Comumente esta técnica é utilizada para a observação dos grânulos de amido, através da qual é possível identificar a origem botânica, obter informações sobre a superfície granular, tamanho, forma e efetividade no isolamento. O conhecimento estrutural dos componentes de um sistema alimentar e da forma como estão organizados auxilia na sua compreensão, visto que existe uma ligação entre estrutura e funcionalidade. Neste contexto, a observação da microestrutura é muito usual e útil inclusive para o entendimento de sistemas mistos de biopolímeros.



#### **1.5.4 Espectroscopia de Infravermelho Médio (MID-IR)**

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica empregada em diversas áreas e que tem sido considerada muito promissora. O emprego desta técnica na análise de alimentos foi revisado por Wilson e Tapp (1999) onde os autores evidenciam a sua importância e a vasta aplicabilidade, principalmente, em estudos estruturais e de identificação de compostos. Possui vantagens por ser relativamente rápida, não destrutiva, apresentar baixo custo, permitir analisar amostras em estado sólido e líquido, para além de não necessitar de nenhum reagente químico.

Esta técnica está fundamentada nas vibrações dos átomos de uma molécula. O espectro de infravermelho resulta da absorção de radiação eletromagnética em frequências relacionadas com a vibração de um determinado conjunto de ligações químicas da molécula, ou seja, os movimentos vibracionais de uma molécula induzem a uma absorção na região infravermelha do espectro electromagnético que é registrada em números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Stuart, 2004; Griffiths e Haseth, 2007). Permite obter espectros que apresentam bandas características dos componentes químicos individuais da matéria-prima em análise, detetando diferenças ou alterações de grupos funcionais específicos. Desta forma é possível obter informações da composição química da amostra, bem como a distinção de espécies vegetais diferentes para além da distinção química de uma mesma espécie (Schulz e Baranska, 2007).

O MID-IR ( $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ ) também é amplamente utilizado para a observação de possíveis interações que podem ocorrer quando duas ou mais substâncias são misturadas. Estas interações são refletidas através de mudanças nas bandas espectrais características (Xu *et al.*, 2005; Bourtoom e Chinnan, 2008) e a ocorrência de interações e/ou modificações químicas podem ser detetadas pelo surgimento ou desaparecimento de bandas (Czubenko e Druzynska, 2009; Ávila *et al.*, 2012; Leceta *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2012a), deslocamentos de bandas de absorvância para números de ondas maiores ou menores (Xu *et al.*, 2005; Lewandowska, 2011; Martins *et al.*, 2012b) assim como alterações na intensidade de absorvância (Zhang *et al.*, 2012).

Apesar do reconhecido potencial existente na utilização da espectroscopia de infravermelho, as bandas obtidas por esta técnica apresentam perfis característicos, porém, de grande complexidade na distinção das informações fornecidas. A associação da quimiometria (estatística aplicada à química) com os espectros de MID-IR tem agregado muito para o melhor esclarecimento e extração de informações de uma vasta gama de matérias-primas.

Através da quimiometria são aplicados métodos matemáticos, estatísticos e computacionais que permitem investigar, interpretar, classificar e fazer a previsão dos conjuntos de dados em que se tenha interesse químico. Desta maneira os métodos de análise exploratória são utilizados para extrair informações e detetar tendências nos dados. Dentre estes métodos existe uma classificação entre os supervisionados e os não supervisionados. Para utilizar os supervisionados (ex.: PLS) é necessária alguma informação inicial da amostra para desenvolver um modelo ao contrário dos não supervisionados (ex.: PCA) (Souza e Poppi, 2012).

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um dos métodos mais importantes e utilizados na quimiometria. É a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. Comumente a PCA é utilizada com o objetivo de encontrar similaridades e diferenças entre amostras, assinalar amostras anômalas e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, identificando agrupamentos naturais entre as amostras (Souza e Poppi, 2012).





## ***Capítulo 2***- Isolamento e Caracterização dos Amidos de Variedades de Milhos Crioulos Brasileiros (*Zea mays* L.)

---



\*

\* Disponível em: <http://www.ruralpecuaria.com.br/2012/10/mapa-sementes-de-milho-crioulo.html>



## **2.1 INTRODUÇÃO**

O amido é um dos biopolímeros mais utilizados mundialmente em diversos âmbitos industriais, provém de diferentes fontes e é constituído pelas macromoléculas de amilose e amilopectina que diferem em proporção e estrutura (Appelqvist e Debet, 1997; Singh *et al.*, 2003; Tester *et al.*, 2004; Copeland *et al.*, 2009). A sua funcionalidade varia significativamente dentro e entre espécies botânicas e também entre o mesmo cultivar quando este se desenvolve sob diferentes condições ambientais e/ou sistemas de manejo (Copeland *et al.*, 2009). Desta forma, cada amido é singular em termos de organização dos seus grânulos e da estrutura dos seus constituintes poliméricos, com as variações na composição do amido extraído a influenciarem diretamente em suas propriedades funcionais e consequentemente em suas aplicações (Cereda *et al.*, 2002; Copeland *et al.*, 2009).

As propriedades funcionais do amido, nomeadamente a gelatinização e a retrogradação, já foram explicadas no capítulo anterior (item 1.1.2) sendo reconhecida a importância do seu conhecimento para poder melhorar e desenvolver produtos nos quais este biopolímero está presente na formulação. Igualmente já foram mencionadas as diversas áreas de sua aplicação (item 1.1.3), principalmente na indústria alimentar como, por exemplo, agente gelificante, espessante ou modificador de volume, características que o fazem contribuir de forma significativa para a textura e qualidade final de diversos produtos alimentares.

Entretanto, na sua forma natural, os amidos podem não atender as necessidades da indústria para determinados requerimentos de processamento como, por exemplo, textura desejável, estabilidade durante o armazenamento a frio e em ciclos de congelamento e descongelamento, entre outros (BeMiller, 2011). Devido a estes fatores surgem as modificações que podem ser feitas no amido para adequá-lo a aplicações específicas, embora a preferência clara dos consumidores por alimentos naturais faça com que as modificações (principalmente as químicas) sejam vistas de forma negativa. Este fator, cada vez mais emergente, acarreta o interesse das indústrias pela identificação de matérias-primas amiláceas naturais com propriedades diversificadas que atendam as exigências do

mercado consumidor e que possam suprir as necessidades tecnológicas.

Dentre as fontes mais utilizadas de amido, o milho destaca-se a nível de produção mundial com 872 milhões de toneladas e deste montante o Brasil, 3º maior produtor mundial, gera 71 milhões de toneladas as quais representam 8.1% da produção mundial (FAOSTAT, 2012). Porém, o decréscimo da agrobiodiversidade compromete as culturas agrícolas de populações locais (Correa *et al.*, 2007). De fato, de acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/ONU), no decorrer do século XX, cerca de três quartos da diversidade genética dos cultivos agrícolas foi perdida.

Neste contexto encontram-se os milhos crioulos. Durante o extenso cultivo deste cereal foram perdidas inúmeras variedades primitivas. As sementes chamadas crioulas ou locais são aquelas conservadas, melhoradas e adaptadas pelos agricultores através de métodos próprios e sistema de manejo, desde os primórdios da agricultura. Estas variedades evoluíram sob condições ambientais, sistemas de cultivo e preferências culturais específicas e exercem um papel fundamental no desenvolvimento de sistemas agroecológicos, pois adaptaram-se para tolerar as mudanças ambientais e os agentes patogênicos prejudiciais para as plantas. Esta adaptação faz com que as variedades crioulas sejam cultivadas com pouco ou nenhum aporte de insumos externos (diminuindo o impacto no meio ambiente), ao contrário do que ocorre com as sementes híbridas comerciais, nas quais o potencial produtivo está diretamente ligado à aplicação de altas doses de insumos químicos. Mesmo em condições ambientais adversas, como as que frequentemente são encontradas na rotina da agricultura familiar, as variedades crioulas são capazes de manter produções satisfatórias e, para além de serem produtivas, são também de livre acesso e fácil multiplicação pelas famílias agricultoras, tornando desnecessária a aquisição no mercado a cada safra. A sua utilização permite aos agricultores autonomia no controlo da produção das sementes e a possibilidade de experimentação entre variedades, fator que os tornam independentes em relação às grandes corporações (Correa e Weid, 2006). Ao mesmo tempo em que a valorização destas variedades crioulas recupera e conserva a biodiversidade, as iniciativas de preservação revitalizam culturas e modos de vida responsáveis pelo uso sustentável dos recursos genéticos (Correa *et al.*, 2007).



Um dos objetivos desta tese foi a caracterização de amidos provenientes de variedades crioulas de milho, fontes naturais e ainda não exploradas quanto a esta fração, com vista à identificação de possíveis propriedades funcionais diversificadas. Espera-se assim contribuir com este mercado e ter um papel determinante para a manutenção da biodiversidade e para o estímulo da produção orgânica e agroecológica através da valorização da variabilidade genética (direcionamento para aplicações específicas), com base no conhecimento fundamental das propriedades funcionais e tecnológicas destes amidos.

Assim, o objetivo principal deste capítulo foi o isolamento e a caracterização de seis amidos de variedades de milhos crioulos brasileiros em relação às suas propriedades funcionais de gelatinização e retrogradação. Para esta finalidade foram aplicadas técnicas de análises físico-químicas, técnicas de análise estrutural como a difração de raios-X (WAXS), microscopia eletrônica de varrimento (MEV), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), espectroscopia de infravermelho (MID-IR) associada à quimiometria, para além da análise térmica dos amidos (DSC) e de ensaios reológicos oscilatórios, a baixa amplitude de deformação.

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1 Materiais**

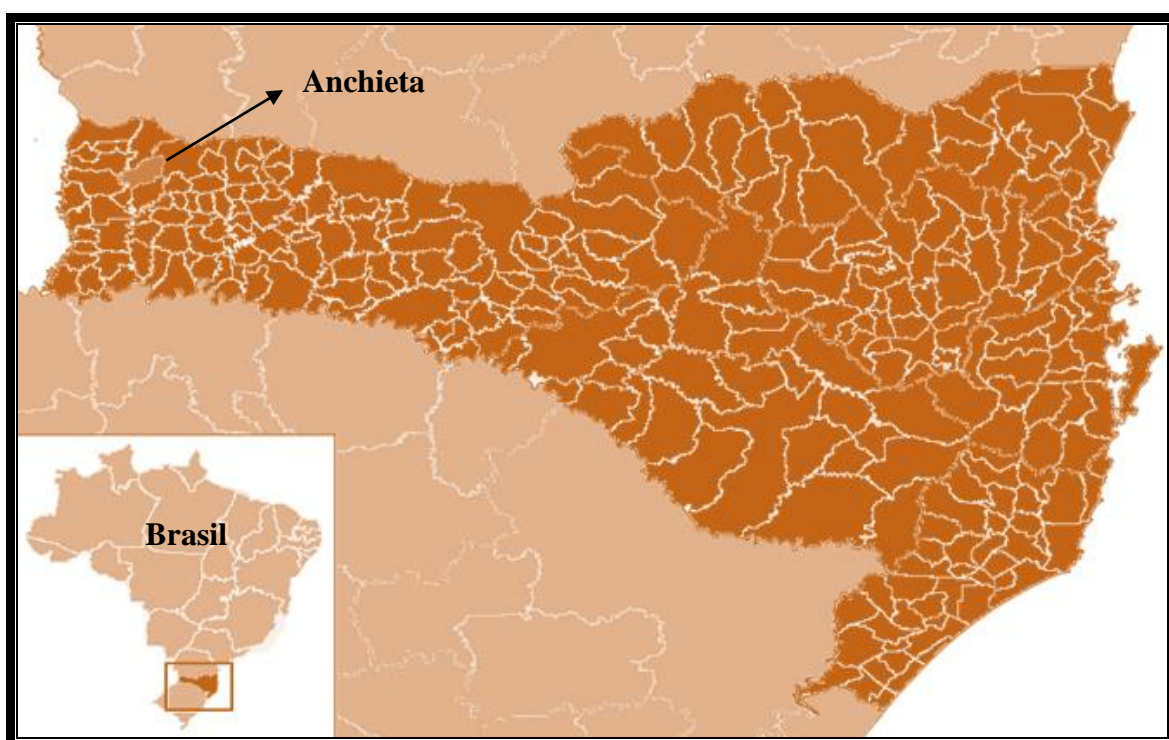
Para a realização desta pesquisa utilizaram-se seis variedades de milhos crioulos provenientes da cidade de Anchieta localizada no extremo oeste do estado de Santa Catarina – Brasil (Figura 2.1). Estas variedades foram cedidas por pequenos agricultores locais ao Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Por sua vez, o núcleo *NeaBio* responsabilizou-se pelo envio das amostras para o Departamento de Química da Universidade de Aveiro (Unidade de Investigação de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares) – Portugal, local onde foi realizado o isolamento dos amidos e a sua caracterização. Em conformidade com as normas de transporte de sementes entre países (Brasil – Portugal), as amostras (sementes de milho) foram grosseiramente quebradas antes do envio para Portugal. As variedades de milhos crioulos utilizadas neste capítulo de tese estão citadas a seguir, assim como algumas de suas características descritas em Canci *et al.* (2004):

- Branco (BR): selecionada após o cruzamento de 20 variedades do Estado do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina - Anchieta (cor do grão: branco; tipo de grão: semi dentado);
- Cateto Vermelho (CV): selecionada no Estado do Paraná por um agricultor da cidade de Romelandia – SC. Cultivado há 17 anos na cidade de Anchieta, apresenta florescimento completo em 69 dias (cor do grão: 95% vermelho e 5% amarelo; tipo de grão: semi dentado);
- Pixurum (PIX): originária da seleção de 216 variedades crioulas do sul do Brasil e posteriormente do cruzamento das 20 melhores com uma cultivar melhorada. Florescimento completo em 71 dias (cor do grão: amarelo e alaranjado; tipo de grão: semi dentado);
- Mato Grosso (MT): desenvolvida a partir de 4 variedades trazidas do Estado do Rio Grande do Sul para Anchieta há 49 anos. Florescimento completo em 70 dias (cor

do grão: amarelo; tipo de grão: dentado);

- Pires (PIR): selecionada por um pequeno agricultor de Anchieta e seu processo de cruzamento não é documentado (cor do grão: amarelo; tipo de grão: dentado);
- MPA 01 (MPA): resultante do cruzamento de uma série de variedades crioulas com um conjunto de comerciais, seguido de um processo seletivo pelos agricultores de Anchieta e dos arredores (cor do grão: alaranjado; tipo de grão: semi dentado).

Para efeitos comparativos as análises também foram realizadas para amido de milho comercial (COM) adquirido numa superfície comercial em Portugal (Maizena®, Unilever Jerónimo Martins Lda.).



**Figura 2.1:** Mapa do estado de Santa Catarina – Brasil.

Identificação da cidade de Anchieta (local de produção das variedades de milhos crioulos).

Adquirido em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SantaCatarina\\_Municip\\_Anchieta.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SantaCatarina_Municip_Anchieta.svg)

## **2.2.2 Métodos**

### **2.2.2.1 Isolamento do Amido**

Para o isolamento do amido das variedades crioulas, as sementes de milho grosseiramente quebradas foram colocadas em azoto líquido (com a finalidade de evitar a danificação dos grânulos) e levemente trituradas em moinho de café (Moulinex®). Logo após, os lípidos foram removidos com *n*-hexano por extração contínua durante 5 a 6 horas utilizando-se o método clássico de Soxhlet (1879). Cabe ressaltar que também foi testada a extração dos lípidos a frio segundo o método de Bligh e Dyer (1959) que utiliza clorofórmio, metanol e água na proporção de 1:2:0.8 (v/v). Ao avaliar as duas metodologias testadas, suas vantagens e desvantagens quanto a aspectos como toxicidade, tempo e simplicidade de extração, optou-se pelo método de Soxhlet.

Posteriormente à remoção dos lípidos procedeu-se a extração das proteínas com base na metodologia descrita em Wallace *et al.* (1990). Para isso, as amostras foram dispersas a 10% (m/m) em tampão alcalino (borato de sódio) contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 1% de 2-mercaptoetanol. Após permanecerem sob agitação lenta e constante à temperatura ambiente durante 1 hora foram centrifugadas (15 minutos, 5000 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Na sequência, as amostras foram colocadas em etanol 70% sob agitação lenta durante 30 minutos e centrifugadas. Em seguida, efetuaram-se sucessivas lavagens com água destilada. Para a remoção das fibras e outros materiais insolúveis efetuou-se o procedimento de peneiração húmida (diâmetro de poro: 44 µm - 325 mesh) (Sandhu *et al.*, 2004) com posterior centrifugação. Seguidamente, os amidos foram lavados com solventes orgânicos de volatilidade crescente (etanol, acetona e éter etílico) e secos em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 24 horas (Sandhu *et al.*, 2004). Finalmente, os amidos foram armazenados em exsicador até serem analisados. O procedimento utilizado para isolar os amidos encontra-se esquematizado na Figura 2.2.

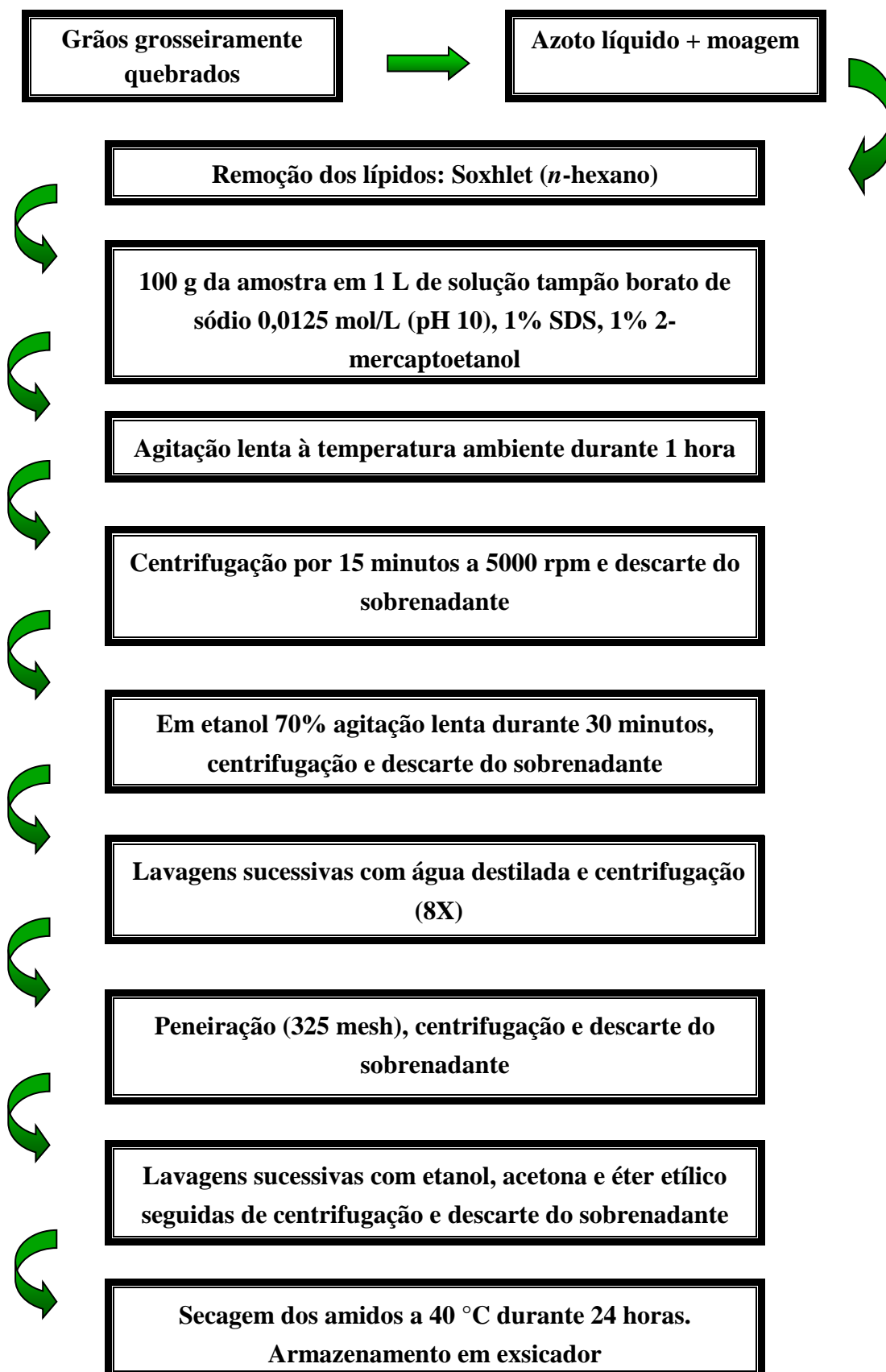


Figura 2.2: Esquema do procedimento utilizado para isolar os amidos.

#### **2.2.2.2 Determinação do Teor de Humidade**

O teor de humidade dos amidos foi determinado através do método nº 55 sugerido pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 1995), o qual consiste na permanência de aproximadamente 3 g da amostra em estufa com circulação de ar a 105 °C durante 12 horas. As análises foram realizadas em triplicado.

#### **2.2.2.3 Determinação do Teor de Cinzas ou Resíduo Mineral**

A determinação do teor de cinzas foi realizada segundo método nº 08-17 sugerido pela *American Association of Cereal Chemists* (AACC, 1995). Aproximadamente 3 g da amostra, em cadinhos de porcelana, foram previamente incineradas dentro da *hotte* em uma chapa de aquecimento. Após não haver mais liberação de fumo, foram colocadas na mufla a 525 °C durante aproximadamente 10 horas. As análises foram realizadas em triplicado.

#### **2.2.2.4 Determinação do Teor de Proteínas**

Através da análise elementar (permite a determinação de percentagens de carbono, azoto, hidrogénio e enxofre) foi obtido o teor de proteínas nos amidos. Para tal, utilizou-se um *Elementar Analyser CHN* (modelo 2400 - Perkin Elmer®). Para calcular o teor de proteínas com base no teor de azoto utilizou-se o fator de conversão N x 6,25. As análises foram realizadas em triplicado.

#### **2.2.2.5 Determinação do Teor de Lípidos**

A determinação do teor de lípidos nos amidos foi realizada pelo método de Soxhlet sugerido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995) nº 920.39. Foi utilizado o *n*-hexano como solvente de extração. Pesaram-se aproximadamente 5 g de amostra em cartucho de celulose o qual foi colocado dentro do tubo de extração. A extração contínua decorreu sob refluxo (68-70 °C) por aproximadamente 5 a 6 horas. Após a extração, removeu-se o solvente em evaporador rotativo e colocou-se o balão com o

extrato concentrado durante 2 horas em estufa a  $\pm 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As análises foram realizadas em triplicado.

#### **2.2.2.6 Determinação do Teor de Amido Total**

O teor de amido total foi determinado através do método enzimático proposto por McCleary *et al.* (1994), com a utilização de um kit de doseamento da Megazyme® (*Megazyme Total Starch Kit, Megazyme, Wicklow, Ireland*). O princípio desta metodologia está na hidrólise do amido que é realizada em duas fases: na primeira, o amido é parcialmente hidrolisado e posteriormente solubilizado ( $\alpha$ -amilase). Na segunda fase as dextrinas são hidrolisadas a glucose pela amiloglucosidase. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Jenway® 6405) a 510 nm.

#### **2.2.2.7 Determinação do Teor de Amido Danificado**

O método utilizado para determinar o teor de amido danificado foi descrito por Gibson *et al.* (1991), utilizando um kit enzimático da Megazyme® (*Megazyme Damaged Starch kit, Megazyme, Wicklow, Ireland*). Neste método, os grânulos de amido danificados são hidratados e hidrolisados através de tratamento controlado com  $\alpha$ -amilase visando à solubilização dos grânulos danificados com o mínimo de interferência nos grânulos que não sofreram dano. Esta reação é terminada com a adição de ácido sulfúrico diluído e alíquotas são tratadas com amiloglucosidase para a completa degradação de dextrinas para glucose. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Jenway® 6405) a 510 nm.

#### **2.2.2.8 Determinação do Teor de Amilose – Método Colorimétrico por Afinidade ao Iodo**

O teor de amilose foi determinado pelo método colorimétrico (Juliano, 1971 *apud* Nwokocha e Williams, 2009). Para 0,1 g de amido foi adicionado 1 mL de etanol (95%) e posteriormente 9 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L. Aqueceu-se em banho de água a 100

°C por 10 minutos (para gelatinizar o amido). Deixou-se arrefecer e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL completando-se com água destilada. Transferiu-se 5 mL da solução obtida para outro balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se 1 mL de ácido acético 1 mol/L seguido de 2 mL de solução de iodo (0,2 g I<sub>2</sub> / 2 g KI) e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Homogeneizou-se e deixou-se em repouso durante 30 minutos (para o desenvolvimento da coloração). Mediu-se a absorvância de cada amostra a 620 nm em espectrofotômetro (Jenway® 6405), utilizando como branco uma solução de iodo da mesma concentração (sem adição de amido). O teor de amilose das amostras foi obtido por interpolação a partir de uma curva de calibração construída com amilose pura de batata (Sigma-Aldrich®). As análises foram realizadas em triplicado.

### 2.2.2.9 Determinação do Teor de Amilose – Método Enzimático

O teor de amilose também foi determinado de acordo com o método descrito por Gibson *et al.* (1997), utilizando um kit enzimático da Megazyme® (*Megazyme Amylose/Amilopectin kit, Megazyme, Wicklow, Ireland*). Esta metodologia consiste em três fases: pré-tratamento do amido, precipitação da amilopectina com determinação da amilose e determinação do amido total. Basicamente as amostras de amido são dispersas e aquecidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Os lípidos são removidos por precipitação do amido em etanol e recuperação do precipitado. Na sequência é adicionado DMSO à amostra e a amilopectina é especificamente precipitada pela adição de concanavalina (Con A) e removida por centrifugação. Uma alíquota da amilose presente no sobrenadante é enzimaticamente hidrolisada e analisada utilizando o reagente GOPOD (glucose oxidase/peroxidase). A leitura da absorvância foi realizada por espectrofotometria (Jenway® 6405) a 510 nm. Seguidamente, uma alíquota do amido total também é hidrolisado e similarmente analisado colorimetricamente. O teor de amilose na amostra de amido é estimado como a razão das absorvâncias.



### **2.2.2.10 Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)**

Para a análise da morfologia e tamanho dos grânulos, os amidos foram colocados em suportes de alumínio (*stubs*), recobertos com uma película de carbono em equipamento de deposição de carbono (Emitech® K950) e observados no Microscópio Eletrónico de Varrimento (Hitachi® S4100). Utilizaram-se ampliações de 700 e 2500 vezes, sob aceleração de voltagem de 25 kV.

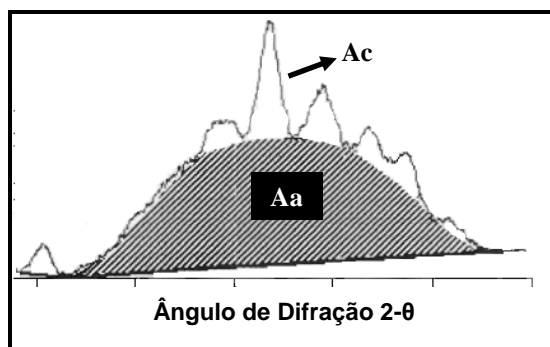
### **2.2.2.11 Determinação do Poder de Inchamento dos Grânulos**

Para determinar o poder de inchamento dos grânulos de amido (Leach *et al.*, 1959), foram pesados 0,2 g de cada amostra em tubos de centrífuga (previamente pesados) e adicionou-se 18 g de água destilada. A suspensão foi agitada algumas vezes e levada ao banho com aquecimento e agitação leve e constante durante 30 minutos as temperaturas de 65 e 90 °C. Na sequência, os tubos foram removidos do banho térmico, arrefecidos e centrifugados (15 minutos a 3400 rpm). O sobrenadante foi removido, as paredes externas dos tubos foram secas e estes foram cuidadosamente pesados. O poder de inchamento foi determinado através da razão da massa intumescida pela massa inicial de amido. As análises foram realizadas em duplicado.

### **2.2.2.12 Difração de Raios-X (WAXS)**

O padrão de difração de raios-X foi obtido utilizando-se um difratómetro de raios-X (Philips® X'Pert MPD). A faixa de medição foi de 5° a 40°, com uma velocidade de 0,45°/min, operando a 35 kV e 15 mA, com radiação incidente  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$  de CuK $\alpha$  na escala de 2- $\theta$ . As análises foram realizadas em duplicado no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro. As percentagens de cristalinidade foram estimadas pelo *software winplotR*, segundo a equação 2.1 e como ilustrado no exemplo da Figura 2.3, correspondendo à razão entre a área da região cristalina ( $A_c$ ) e a área total ( $A_c + A_a$ ), ou seja, área cristalina e área amorfa ( $A_a$ ).

$$\%C = \left( \frac{A_c}{A_c + A_a} \right) \times 100 \quad \text{(equação 2.1)}$$



**Figura 2.3:** Difratograma para exemplificar a área da região amorfa (Aa: representada pelo preenchimento listado) e área da região cristalina (Ac: representada pelo preenchimento em branco).

### 2.2.2.13 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

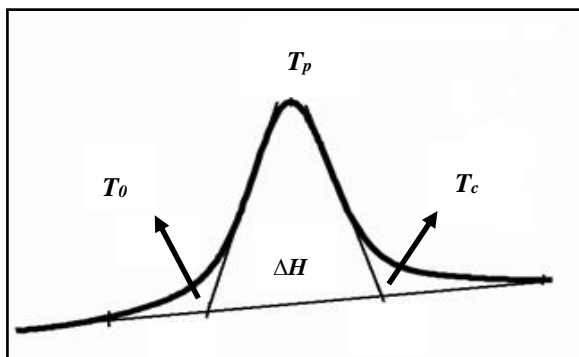
#### 2.2.2.13.1 Gelatinização dos Amidos

O processo de gelatinização dos amidos foi estudado utilizando um calorímetro diferencial de varrimento de compensação de potência (*Perkin-Elmer® Diamond DSC*) com sistema de refrigeração interna em atmosfera de azoto. Para calibração das entalpias usou-se o padrão de índio e para a calibração das temperaturas usou-se o índio e o chumbo.

Foram preparadas suspensões de amido em água a 20% (m/m). As suspensões ficaram sob agitação lenta por duas horas para que houvesse hidratação dos grânulos. Com auxílio de micropipeta, foram inseridos  $\pm 20$  mg em uma cápsula de alumínio (PE Nº BO169320) a qual foi hermeticamente selada. Antes de iniciar o processo, foi acondicionada no calorímetro uma cápsula vazia, idêntica às cápsulas das amostras, que é utilizada como referência. As condições de análise foram as seguintes: atmosfera de azoto com fluxo de 40 mL/min, taxa de aquecimento 10 °C/min, temperatura inicial 20 °C e temperatura final 90 °C.

Os parâmetros térmicos determinados incluíram temperatura inicial ( $T_0$ ), temperatura de pico ( $T_p$ ), temperatura de conclusão ( $T_c$ ) e entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ), calculados automaticamente pelo programa do equipamento (exemplo na Figura 2.4). A faixa de temperatura de gelatinização ( $R_{gel}$ ) e o índice de altura do pico ( $PHI$ ) foram

calculados como  $2(T_p - T_0)$  e  $\Delta H/(T_p - T_0)$ , respetivamente (Sandhu *et al.*, 2004).



**Figura 2.4:** Exemplo de um termograma obtido pelo DSC e da definição dos parâmetros determinados neste estudo ( $T_0$ : temperatura inicial;  $T_p$ : temperatura de pico;  $T_c$ : temperatura de conclusão e  $\Delta H$ : variação da entalpia).

#### 2.2.2.13.2 Retrogradação dos Amidos

Para as análises de retrogradação, as mesmas cápsulas com as amostras gelatinizadas foram armazenadas a 4 °C durante 7, 14 e 40 dias e submetidas novamente à análise no calorímetro. Antes das análises as cápsulas foram deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente e reaquecidas sob as mesmas condições descritas na gelatinização. A percentagem de retrogradação ( $R$ ) foi calculada de acordo com a equação 2.2 (Karim *et al.*, 2000; Sandhu e Singh, 2007).

$$\% R = \left( \frac{\text{entalpiade retrogradação}}{\text{entalpiade gelatinização}} \right) \times 100 \quad (\text{equação 2.2})$$

#### 2.2.2.14 Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS): Análise das Ligações Glucosídicas

Para a identificação e posterior quantificação das ligações glucosídicas dos amidos (para verificar a percentagem de ramificação) realizou-se a técnica de metilação e

## Capítulo 2 – Caracterização dos Amidos

utilizou-se a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Consiste na metilação que ocorre na reação entre o iodeto de metilo e os grupos hidroxilo livres do polissacarídeo (todos os grupos hidroxilo que não estão envolvidos nas ligações glucosídicas ou que fazem parte do anel). Na sequência faz-se a hidrólise dos polissacarídeos metilados. Para a análise através da cromatografia em fase gasosa os monossacarídeos precisam ser derivatizados para compostos voláteis. Isto é feito por redução dos carbonos anoméricos dos monossacarídeos resultantes e acetilação dos grupos hidroxilo formados. Desta forma, os acetatos de alditol parcialmente metilados podem ser separados, identificados e quantificados por GC-MS (Coimbra *et al.*, 2004). O procedimento seguido foi adaptado da metodologia proposta por Ciucanu e Kerek (1984) descrito em Coimbra *et al.* (1996).

Metilação: Pesou-se entre 1 e 2 mg dos amidos em tubos de centrífuga concentradora *speedvac* (Unicryo® MC-2L-60 °C). Adicionou-se 1 mL de DMSO (seco em peneiras moleculares de 3 Å) e deixou-se em agitação durante a noite para dissolução completa da amostra. Triturou-se cerca de 40 mg de NaOH e adicionou-se a cada amostra. Deixou-se em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 100 µL de CH<sub>3</sub>I (iodeto de metilo) com uma seringa e deixou-se reagir durante 20 minutos sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>O e acidificou-se com HCl 1 mol/L (pH ≈ 2). Adicionou-se 3 mL de diclorometano, agitou-se muito bem (manualmente) e centrifugou-se durante 30 segundos a 2500 rpm (para a separação das fases). Aspirou-se a fase aquosa por sucção e lavou-se a fase orgânica com 2 mL de água destilada repetindo-se esta etapa até o diclorometano ficar límpido (agitação manual e centrifugação). Na sequência o diclorometano foi evaporado até à secura em centrífuga concentradora *speedvac*.

Hidrólise: Procedeu-se a hidrólise ácida das ligações glucosídicas com 500 µL de ácido trifluoroacético 2 mol/L e incubou-se a 121 °C durante 1 hora (agitando-se de vez em quando). Na sequência o ácido foi evaporado até à secura em centrífuga concentradora *speedvac*.

Derivatização (redução e acetilação): Adicionou-se 300 µL de NH<sub>3</sub> 2 mol/L e 20

mg do agente redutor borohidreto de sódio deuterado NaBD<sub>4</sub> (reduz os monossacarídeos a alditóis) ao resíduo obtido da hidrólise e deixou-se reagir durante 1 hora a 30 °C. Após arrefecer os tubos em banho de gelo adicionou-se 2 vezes 50 µL de ácido acético glacial (para eliminar o excesso de BD<sub>4</sub><sup>-</sup>). Adicionou-se 450 µL de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de anidrido acético (para acetilar os alditóis originando acetatos de alditol). Agitou-se e incubou-se em bloco de aquecimento a 30 °C durante 30 minutos. Em banho de gelo, adicionou-se 3 mL de água destilada (para decompor o excesso de anidrido acético) e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se bem (manualmente) para extrair os acetatos de alditol. Centrifugou-se por 30 segundos a 2500 rpm (para separação em duas fases). A fase aquosa foi aspirada por sucção. Na sequência adicionou-se mais 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa de acordo com o descrito anteriormente. Lavou-se a fase orgânica com 3 mL de água destilada, agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa (sucção). O diclorometano foi evaporado na centrífuga concentradora *speedvac*. Para finalizar adicionou-se 1 mL de acetona anidra e evaporou-se como descrito anteriormente. Repetiu-se este passo e os tubos foram mantidos em exsiccador até as amostras serem injetadas no sistema de GC-MS.

Comparativamente e para garantir a eficiência da metilação este procedimento também foi realizado nos amidos após gelatinização e liofilização. Para tal, foram realizadas modificações nesta etapa as quais são descritas a seguir.

Metilação: Aumentou-se a quantidade de NaOH para 80 mg, deixou-se em sonificador durante 1 hora e em agitação por mais 1 hora à temperatura ambiente. Adicionou-se 100 µL de iodeto de metilo e deixou-se reagir durante 30 minutos sob sonicação e mais 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Após, as amostras foram novamente metiladas como descrito. Os passos seguintes (hidrólise e derivatização) foram realizados sem modificações.

Para a obtenção dos cromatogramas no GC-MS (Agilent Technologies®\_6890N) diluiu-se os acetatos de alditol em 150 µL de acetona anidra e para a volatilização injetou-se 0,5 µL utilizando-se como fase estacionária uma coluna capilar apolar DB1-MS (25 m

de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,05 µL de espessura) e como fase móvel o gás hélio. Antes das injeções foi realizada uma corrida de branco (acetona) para garantir a eliminação de eventuais resíduos na coluna. O programa de temperaturas do forno utilizado foi: temperatura inicial de 50 °C (evolução a 8 °C/min) permanecendo a 140 °C durante 5 minutos (evolução a 0,5 °C/min) até 150 °C (evolução a 40 °C/min) chegando a 280 °C e mantendo-se a esta temperatura durante 1 minuto. A separação através do GC acoplado ao detetor MS permite a identificação e quantificação das ligações glucosídicas existentes nas amostras em estudo. A identificação foi efetuada através de comparação dos tempos de retenção e espectros de massa com padrões anteriormente publicados e conhecidos que fazem parte da base de dados do laboratório. Para a determinação das percentagens de ramificação dos amidos fez-se a integração da área dos picos identificados: glucose terminal (GLC-T), glucose com ligação 1,4 (GLC-1,4) e glucose com ligação 1,6 (GLC-1,6). Seguidamente dividiu-se a área dos picos referentes às ramificações (GLC-1,6) pela área total dos picos de GLC-T, GLC-1,4 e GLC-1,6.

### 2.2.2.15 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR) e Quimiometria

As análises por espectroscopia de infravermelho (MID-IR) foram realizadas em um espectrometro IFS55 (Bruker®) com acessório de ATR de reflexão única (Golden-Gate). Os amidos foram previamente colocados em estufa de vazio (Gallenkamp®) na presença do dessecante pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) durante cinco dias, retirados e guardados em exsiccador 20 minutos antes do início da aquisição dos espectros. Todos os espectros foram adquiridos na forma de absorvância (4000 a 500 cm<sup>-1</sup>), com resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e 128 varrimentos.

Foi utilizada uma porção suficiente de amido para cobrir a célula do acessório de ATR e após a aquisição de cada espectro a amostra foi remexida com auxílio de uma espátula para alterar o seu empacotamento realizando-se nova aquisição. Cada amido foi analisado oito vezes com a realização de um branco (*background*) a cada troca de amostra. Os espectros foram analisados através do *software* OPUS® (versão 5.0).

Após a análise direta dos espectros do MID-IR os espectros em formato jcamp.dx foram submetidos à análise multivariada no programa informático CATS®, desenvolvido em parceria pela Universidade de Aveiro e o *Institut National Agronomique Paris – Grignon* (Barros, 1999). Para extrair o máximo de informações possíveis, realizaram-se dois tipos de análise multivariada para os espectros obtidos, nomeadamente: Análise em Componentes Principais (*Principal Components Analysis* - PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Square* – PLS1).

A análise em componentes principais (PCA) foi realizada com os dados espectrais com o objetivo de visualizar-se a obtenção de agrupamentos das amostras. Através do gráfico dos *scores* obtém-se a visualização da posição das amostras que apresentam (ou não) características diferenciadas de acordo com a junção ou dispersão das mesmas (representação das coordenadas fatoriais). Já o gráfico dos *loadings* fornece a informação sobre as variáveis que contribuíram para a separação de determinada amostra do restante do conjunto (representação das contribuições fatoriais). As zonas espectrais exploradas foram: região dos polissacarídeos ( $1200$  a  $800\text{ cm}^{-1}$ ) e toda a região do espectro ( $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ). Neste último caso, eliminou-se a região entre  $4000$  a  $3700\text{ cm}^{-1}$  devido à interferência de ruídos e a região entre  $2450$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$  pela interferência do  $\text{CO}_2$  atmosférico e ruídos.

A análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS1) foi aplicada para tentar estabelecer uma relação entre os espectros do MID-IR com os dados físico-químicos e com os dados das análises térmicas obtidos para os mesmos amidos. Foram construídos modelos de calibração multivariados e as zonas espectrais exploradas foram: região dos lípidos ( $1800$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ ), região das proteínas ( $1700$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ ), região dos polissacarídeos ( $1200$  a  $800\text{ cm}^{-1}$ ) e toda a zona espectral ( $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) com os cortes mencionados anteriormente.

### 2.2.2.16 Caracterização do Comportamento Reológico – Propriedades Dinâmicas

Para o estudo do comportamento reológico dos amidos de milho crioulos

## Capítulo 2 – Caracterização dos Amidos

realizaram-se ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação. Os ensaios foram conduzidos com a utilização de um reómetro de tensão controlada (Bohlin®, CVO 120 HR). Para as análises utilizou-se um sistema de placas paralelas (placa rugosa, 4 cm de diâmetro, 1,0 mm de gap). Selecionou-se uma placa rugosa com o objetivo de melhorar a adesão da amostra ao equipamento.

Para a caracterização reológica dos amidos foram preparadas suspensões de amido em água, partindo-se de 4 g da amostra, utilizando as seguintes concentrações de amido: 10% e 20% (m/m). Depois de preparadas, as suspensões foram deixadas sob agitação lenta com barra magnética durante 2 horas para garantir uma hidratação homogênea e com a finalidade de evitar a sedimentação dos grânulos hidratados e intumescidos. Após a sua preparação, as amostras foram cuidadosamente transferidas para a placa inferior do reómetro. Com a intenção de minimizar perdas de água por evaporação colocou-se ao redor da amostra um anel de acrílico aderido à placa inferior com silicone e preencheu-se com óleo mineral de baixa viscosidade ( $d=0.84$  g/mL, Sigma-Aldrich® Química SA, Sintra, Portugal).

Os ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação realizaram-se dentro da zona de comportamento viscoelástico essencialmente linear (*LVR – linear viscoelastic region*) para que a tensão aplicada não afetasse a estrutura das amostras. Assim, foram realizados testes preliminares de varrimento de tensão oscilatória com a utilização de uma frequência constante de 2 rad/s. Com isto, a amplitude de deformação definida para os ensaios foi de 1%. Para a caracterização dos amidos realizaram-se dois tipos de ensaios reológicos dinâmicos: ensaios de varrimento em temperatura (aquecimento e arrefecimento) e ensaios de varrimento em frequência de oscilação.

A gelatinização dos amidos foi realizada diretamente no reómetro no qual as amostras passaram por um ciclo de temperatura de 40 °C – 90 °C – 20 °C, a uma taxa de variação de temperatura de 1 °C/minuto, com uma frequência de oscilação constante de 2 rad/s e amplitude de deformação de 1%. Optou-se por iniciar o ciclo de temperatura a 40 °C por tratar-se de uma suspensão e por esta temperatura ser mais próxima da temperatura de gelatinização do amido. Depois de alcançar os 90 °C, as amostras foram mantidas a esta



temperatura durante 10 minutos e iniciou-se o arrefecimento com a mesma taxa de variação de temperatura até 20 °C. O controlo da temperatura fez-se com precisão de  $\pm 0.1$  °C através do sistema Peltier localizado no prato inferior do sistema de medida do reómetro.

Imediatamente após o arrefecimento para 20 °C, o comportamento viscoelástico dos amidos foi analisado através de ensaios de varrimento em frequência de oscilação realizados numa gama de frequências entre 0.1 - 100 rad/s, a uma temperatura constante de 20 °C e 1% de deformação. Os parâmetros reológicos de interesse foram o módulo elástico ( $G'$ ) e o módulo viscoso ( $G''$ ).

#### **2.2.2.17 Análises Estatísticas**

Quando aplicável, foi realizada análise de variância (ANOVA), para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos. A análise de variância foi conduzida ao nível de significância de 95%, considerando-se significativo  $p \leq 0,05$ . Aplicou-se o teste de Tukey para verificar entre quais resultados existiam as diferenças. De acordo com o citado anteriormente, aplicou-se também o tratamento estatístico nos espectros do MID-IR através da análise multivariada.

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Isolamento dos Amidos**

O isolamento do amido é o primeiro passo para analisar a sua composição e estrutura bem como para avaliar as propriedades tecnológicas desta matéria-prima. Consiste essencialmente na separação dos componentes maioritários do grão (amilose e amilopectina) de outros constituintes menores como os lípidos, as proteínas, as fibras e os minerais. Entre os componentes minoritários, as proteínas e os lípidos são considerados os mais importantes tecnologicamente, pois a sua presença influencia nas propriedades funcionais dos amidos (Appelqvist e Debet, 1997). A origem botânica e a purificação durante a extração estão associadas à quantidade final destes componentes no amido (Baldwin, 2001). Quanto menor o teor final destes constituintes minoritários melhor a qualidade do amido obtido.

Existem diversas metodologias citadas na literatura para extração do amido a nível laboratorial (Raeker *et al.*, 1998; White *et al.*, 1990; Lawal, 2004; Sandhu, *et al.*, 2004; Lawal *et al.*, 2005; Sandhu *et al.*, 2005; Mendez-Montealvo *et al.*, 2006). Entre estas foram testadas, para o isolamento do amido das variedades dos milhos crioulos, o tratamento alcalino com NaOH e NaHSO<sub>3</sub> (Sandhu *et al.*, 2004) e o tratamento com NaHSO<sub>3</sub> e tolueno (Lawal *et al.*, 2005). Entretanto, os amidos resultantes da aplicação destas metodologias apresentaram elevado teor de proteínas (acima de 2%).

De acordo com o descrito em Baldwin (2001), os grânulos de amido, de todas as fontes botânicas, apresentam certa quantidade de proteínas que estão fortemente associadas ao grânulo, as quais consistem em dois tipos distintos: proteínas de superfície que podem permanecer em pequenas quantidades após o isolamento e proteínas associadas ao grânulo, as quais se encontram fortemente ligadas à superfície e/ou presentes no interior do grânulo.

Quanto à extração das proteínas, as da superfície dos grânulos geralmente são removidas de acordo com a sua solubilidade (água, álcool, álcali ou sal) sendo este o critério em que se baseiam as metodologias anteriormente citadas. Todavia também podem

ser utilizadas soluções com dodecil sulfato de sódio (SDS) entre 1 a 2%, com ou sem adição de 2-mercaptoetanol (Seguchi, 1995; Apelqvist e Debet, 1997; Baldwin, 2001). Com a utilização destes reagentes não só as proteínas de superfície mas também as internas podem ser removidas, mas para que isto ocorra é necessário o aquecimento dos grânulos a 50 °C ou a uma temperatura ainda mais elevada, e a remoção completa das proteínas (quer as de superfície quer as internas) requer a aplicação de altas temperaturas (mínimo de 90 °C) (Baldwin, 2001), não sendo este o nosso objetivo.

Kuhnen *et al.* (2010) trabalharam com outras variedades de milhos crioulos da região de Anchieta (mesmo local de cultivo das variedades do presente estudo) e verificaram diferenças na composição e quantidade das proteínas. Algumas variedades destacaram-se pelo baixo conteúdo de prolaminas (que possuem baixos valores de lisina e triptofano) e apresentaram maiores teores de albuminas, globulinas e glutelinas (as quais contêm maiores níveis destes aminoácidos) constatando maior valor nutricional para estas variedades e, como mencionado, diferenças quer na composição quer na quantidade das proteínas presentes entre as variedades crioulas. De acordo com Dombrink-Kurtzman e Knutson (1997) diferenças na composição e no conteúdo das proteínas podem ser relacionadas com diferenças na dureza dos grãos de milho, para além da espessura da matriz proteica em contato com os grânulos de amido e da força de adesão entre esta matriz e os grânulos (Pereira, 2006). Uma forte adesão entre a matriz proteica e os grânulos de amido, de fato, pode ser um fator que dificultou a remoção deste componente dos amidos crioulos (através dos métodos mais usuais de isolamento em laboratório) no presente trabalho.

Desta maneira, visando a obtenção de um amido mais puro, optou-se pelo isolamento como descrito na Figura 2.2 que foi baseado no proposto por Wallace *et al.* (1990) com a utilização de solução alcalina e dos reagentes SDS e 2-mercaptoetanol. Ressalta-se que para não ocasionar alterações no amido é importante fazer a extração a temperatura ambiente, intensificar as lavagens do amido com água no final da extração (para que não permaneçam resíduos dos reagentes nos grânulos) e não utilizar tempos elevados de tratamento devido ao relatado por Seguchi (1995) que após 24 horas observou início de alterações (decréscimo da cristalinidade). Assim, obteve-se uma extração

satisfatória dos componentes minoritários do amido (conforme será demonstrado) e uma composição mais aproximada da encontrada nos amidos extraídos e utilizados pela indústria.

Em relação ao rendimento, através da metodologia utilizada, obteve-se em média 67% (b.s.) de rendimento na extração dos amidos das variedades de milhos crioulos. Singh e Eckhoff (1996) realizaram uma revisão na qual comparam os rendimentos do amido de milho extraído em laboratório e em escala piloto com moagem húmida. Apesar de existir diferenças significativas em alguns dos procedimentos utilizados, a maioria resultou em rendimentos de amido e presença de outros componentes equivalentes aos valores da indústria. Os autores citam rendimentos de amido entre 58,4 e 68,5%.

### **2.3.2 Composição dos Amidos Isolados**

A Tabela 2.1 apresenta a composição dos amidos isolados e a comparação com o amido de proveniência comercial (COM). Ao analisar os resultados da caracterização, verifica-se que, num âmbito geral, dentre as variedades crioulas aqui estudadas, nenhum dos amidos destacou-se pela sua composição química a nível dos componentes maioritários (amilose/amilopectina), conforme é posteriormente discutido.

Os teores de humidade foram bastante semelhantes para todos os amidos crioulos (média de 10%) e estão de acordo com o citado por Copeland *et al.* (2009) que referencia esta percentagem de humidade em grânulos de amido nativo. No amido comercial foi quantificada uma percentagem de humidade um pouco mais elevada, 12% (estatisticamente diferente dos amidos crioulos  $p \geq 0.05$ ). Esta diferença justifica-se tendo em conta os diferentes procedimentos de isolamento, purificação e armazenamento dos amidos. Cereda *et al.* (2002) cita que o Brasil, local de produção das variedades de milhos utilizadas, é um dos países líderes na América Latina na definição de padrões e, de acordo com a legislação brasileira (1978), a humidade no amido não deve ultrapassar 14%, pelo que qualquer uma das amostras de amido estudadas apresenta teores de humidade aceitáveis.

**Tabela 2.1:** Composição dos amidos obtidos a partir das variedades de milhos crioulos e comparação com o amido comercial.

%	BR	CV	PIX	MT	PIR	MPA	COM
<b>Humidade*</b>	<b>10.51<sup>bc</sup></b>	<b>10.29<sup>abc</sup></b>	<b>10.06<sup>a</sup></b>	<b>10.11<sup>a</sup></b>	<b>10.30<sup>abc</sup></b>	<b>10.52<sup>c</sup></b>	<b>12.35<sup>d</sup></b>
	± 0.06	± 0.05	± 0.08	± 0.12	± 0.05	± 0.07	± 0.42
<b>Proteínas*</b>	<b>0.28<sup>ab</sup></b>	<b>0.32<sup>bc</sup></b>	<b>0.36<sup>c</sup></b>	<b>0.35<sup>c</sup></b>	<b>0.34<sup>c</sup></b>	<b>0.37<sup>c</sup></b>	<b>0.24<sup>a</sup></b>
	± 0.03	± 0.04	± 0.03	± 0.04	± 0.01	± 0.03	± 0.00
<b>Lípidos*</b>	<b>0.61<sup>c</sup></b>	<b>0.41<sup>a</sup></b>	<b>0.49<sup>b</sup></b>	<b>0.36<sup>a</sup></b>	<b>0.61<sup>c</sup></b>	<b>0.63<sup>c</sup></b>	<b>0.98<sup>d</sup></b>
	± 0.02	± 0.02	± 0.03	± 0.04	± 0.03	± 0.02	± 0.07
<b>Cinzas*</b>	<b>0.42<sup>c</sup></b>	<b>0.33<sup>b</sup></b>	<b>0.51<sup>d</sup></b>	<b>0.52<sup>de</sup></b>	<b>0.55<sup>e</sup></b>	<b>0.43<sup>c</sup></b>	<b>0.14<sup>a</sup></b>
	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.04
<b>Amido Total**</b>	<b>95.9</b>	<b>98.5</b>	<b>96.7</b>	<b>98.5</b>	<b>96.5</b>	<b>96.04</b>	<b>95.1</b>
	± 0.4	± 0.6	± 0.4	± 0.1	± 0.2	± 0.53	± 0.6
<b>Amido Danificado**</b>	<b>1.32</b>	<b>6.51</b>	<b>4.57</b>	<b>3.99</b>	<b>4.96</b>	<b>1.42</b>	<b>1.33</b>
	± 0.07	± 0.39	± 0.08	± 0.24	± 0.30	± 0.04	± 0.00
<b>Amilose* (iodo)</b>	<b>27.94<sup>bc</sup></b>	<b>28.1<sup>c</sup></b>	<b>28.6<sup>d</sup></b>	<b>27.62<sup>b</sup></b>	<b>27.1<sup>a</sup></b>	<b>28.0<sup>c</sup></b>	<b>27.8<sup>bc</sup></b>
	± 0.34	± 0.1	± 0.2	± 0.07	± 0.1	± 0.2	± 0.12
<b>Amilose*** (enzimático)</b>	<b>25.8</b>	<b>26.2</b>	<b>27.1</b>	<b>24.6</b>	<b>26.8</b>	<b>27.2</b>	<b>26.8</b>

Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Valores expressos em b.s. (exceto para a humidade).

(\*) Os valores apresentados correspondem à média de três ensaios ± desvio padrão.

(\*\*) Os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios ± desvio padrão (utilizando-se como parâmetro a amostra referência fornecida pelo kit enzimático).

(\*\*\*) Os valores apresentados correspondem a um ensaio (utilizando-se como parâmetro a amostra referência fornecida pelo kit enzimático).

Os teores de proteínas residuais dos amidos crioulos também apresentaram valores semelhantes entre 0.28% (BR) e 0.37% (MPA). Somente a percentagem de proteína no amido BR é estatisticamente menor dos demais crioulos (exceção do CV) e semelhante ao amido comercial ( $p \leq 0.05$ ). Amidos purificados geralmente contêm menos de 0.6% de proteínas (Tester *et al.*, 2004), pelo que o método utilizado demonstrou eficiência na extração e originou baixos teores de proteínas residuais. Durante o processamento, as proteínas presentes no amido podem ocasionar sabor e cor indesejáveis (pela reação entre os aminoácidos e os açúcares redutores, reação de Maillard), para além de afetarem a hidratação e interferirem na interação entre grânulos e enzimas hidrolíticas

(Liu, 2005).

Os teores de lípidos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os amidos das variedades crioulas e com relação ao amido comercial. Entre os amidos crioulos os menores teores foram quantificados nas variedades MT e CV (0.36 e 0.41%, respetivamente). O amido da variedade PIX apresentou um teor intermédio (0.49%) e os maiores teores foram quantificados nos amidos BR, PIR e MPA (0.61, 0.61 e 0.63%, respetivamente). O amido comercial apresentou o maior teor de lípidos (0.98%). Pode-se considerar que a extração da fração lipídica foi eficiente visto que, em geral, os amidos de cereais como o milho contêm entre 0.6 a 1% de lípidos (Appelqvist e Debet, 1997).

Para os teores de cinzas foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os amidos crioulos e superiores com relação ao amido comercial. Dentre os crioulos os menores conteúdos de cinzas foram quantificados nos amidos CV, BR e MPA (0.33, 0.42 e 0.43%, respetivamente) e os maiores nos amidos PIX, MT e PIR (0.51, 0.52 e 0.55%, respetivamente). O amido comercial (COM) apresentou a mais baixa percentagem de cinzas em sua composição, 0.14%. A variação no teor de cinzas pode estar diretamente relacionada com o tipo de solo e condições climáticas durante o cultivo do grão e os teores quantificados nos amidos crioulos estão dentro do limite de 0.5% que consta na legislação Brasileira para amidos (Cereda *et al.*, 2002). O conteúdo de cinzas fornece uma indicação dos elementos minerais presentes no amido (principalmente cálcio, magnésio, potássio, sódio e fósforo). Com exceção do fósforo, os minerais apresentam pouco significado a nível funcional (Tester *et al.*, 2004). O fósforo pode estar presente no amido na forma de monoéster de fosfato (ligado especialmente à amilopectina) e na forma de fosfolípidos (complexados principalmente dentro das cadeias helicoidais da amilose) (White, 2001). O amido de milho essencialmente não contém monoésteres de fosfato e dentre os cereais é o que apresenta a menor quantidade de fosfolípidos (0.016%) (White, 2001).

Os teores de amido total foram quantificados entre 96 e 98% e estas percentagens permitem assumir que o processo de isolamento foi eficaz originando valores concordantes com os referidos na literatura para amidos com elevado grau de pureza (acima de 96% de

amido) (Vasanthan, 2001).

Nos teores de amido danificado foi verificada bastante variação entre os amidos em estudo. Os amidos BR e MPA apresentaram os menores valores (1.32 e 1.42%, respectivamente), semelhante ao teor quantificado no amido comercial (1.33%). Os amidos provenientes das variedades MT, PIX e PIR apresentaram teores mais elevados (3.99, 4.57 e 4.96%, respectivamente) e o valor maior foi quantificado no amido da variedade CV (6.51%). De acordo com Tester (1997) que analisou a suscetibilidade à danificação de diferentes fontes de amidos, a composição e a arquitetura do grânulo regulam a sensibilidade à danificação física em função do tempo e da intensidade da força aplicada sobre estes (processo de moagem para extração do amido). Assim, a diferente extensão da danificação dos amidos crioulos pode envolver o procedimento de trituração dos grãos de milho, realizado para o isolamento do amido, associado à estrutura dos grânulos. A danificação do grânulo de amido é uma característica física que pode relacionar-se com a qualidade do produto final visto que envolve a absorção de água pelo grânulo. Os grânulos de amidos intactos absorvem menos água do que os que sofreram dano (Costa *et al.*, 2003). Estes autores citam que o aumento de volume do amido danificado pode ser de até 50% quando em contato com a água. A influência dos diferentes teores de danificação sobre outras propriedades dos amidos é discutida no decorrer do trabalho.

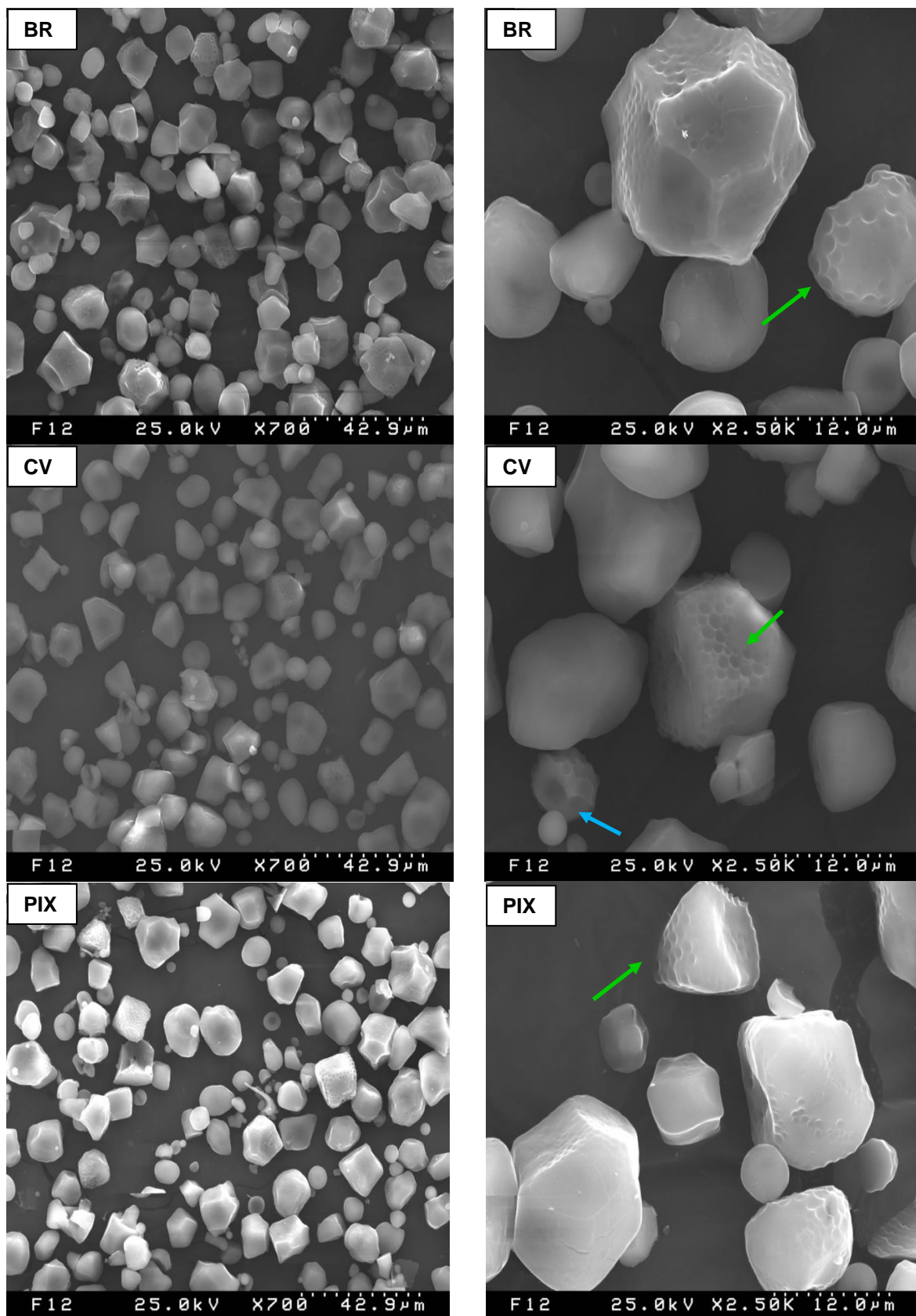
Os teores de amilose dos amidos foram quantificados através de dois métodos com diferentes princípios (método por afinidade da amilose ao iodo e método enzimático utilizando a concanavalina A). O método por afinidade ao iodo baseia-se na capacidade que a estrutura helicoidal da amilose possui em formar complexos de inclusão com o iodo, resultando na coloração azul. Quanto maior for a afinidade pelo iodo, maior será o teor de amilose quantificado no amido. No entanto, se na amostra analisada houver a ocorrência de complexos entre a amilose e lípidos ou amilose de cadeias curtas, os resultados podem ser abaixo do real. Por outro lado, amilose e amilopectina com vários comprimentos de cadeias podem interagir com o iodo e superestimar este teor (Hoover, 2001; Cereda *et al.*, 2002; Copeland *et al.*, 2009). O método enzimático com o uso da lectina concanavalina A é uma alternativa para a quantificação da amilose e especificamente precipita a amilopectina (Gibson *et al.*, 1997; Copeland *et al.*, 2009) não envolvendo problemas com a

amilose. Comparativamente com o método por afinidade de iodo o método enzimático possui a desvantagem do alto custo de análise por amostra. A diferença nos teores de amilose entre os amidos foi pouco significativa. A amilose determinada por afinidade ao iodo resultou em valores um pouco mais elevados que a determinação enzimática, porém a variação máxima entre as duas metodologias não ultrapassou 3%. Pela afinidade ao iodo os valores de amilose variaram entre 27.2 (PIR) e 28.6% (PIX). Pelo método enzimático os valores variaram entre 24.6 (MT) e 27.2% (MPA). Estas diferenças nos resultados entre as metodologias podem ser explicadas pelas interferências que podem ocorrer com o método de iodo, referidas anteriormente. Todavia, independentemente dos métodos de quantificação de amilose utilizados, os amidos das variedades crioulas são classificados como amidos normais e bastante semelhantes entre si quanto aos teores de amilose. Comparativamente e para exemplificar diferentes teores de amilose em amido de milho, pode-se citar o trabalho de Weber *et al.* (2009) que analisaram e compararam as características de amido de milho normal, amido de milho ceroso e amido de milho com alto teor de amilose e obtiveram como teores de amilose 27.8%, 1.8% e 71.0%, respectivamente. Ji *et al.* (2003a) analisaram o teor de amilose (pelo método de iodo) em amidos de milho de linhagens exóticas e não observaram diferenças significativas entre os amidos com teores quantificados entre 29 e 32% de amilose.

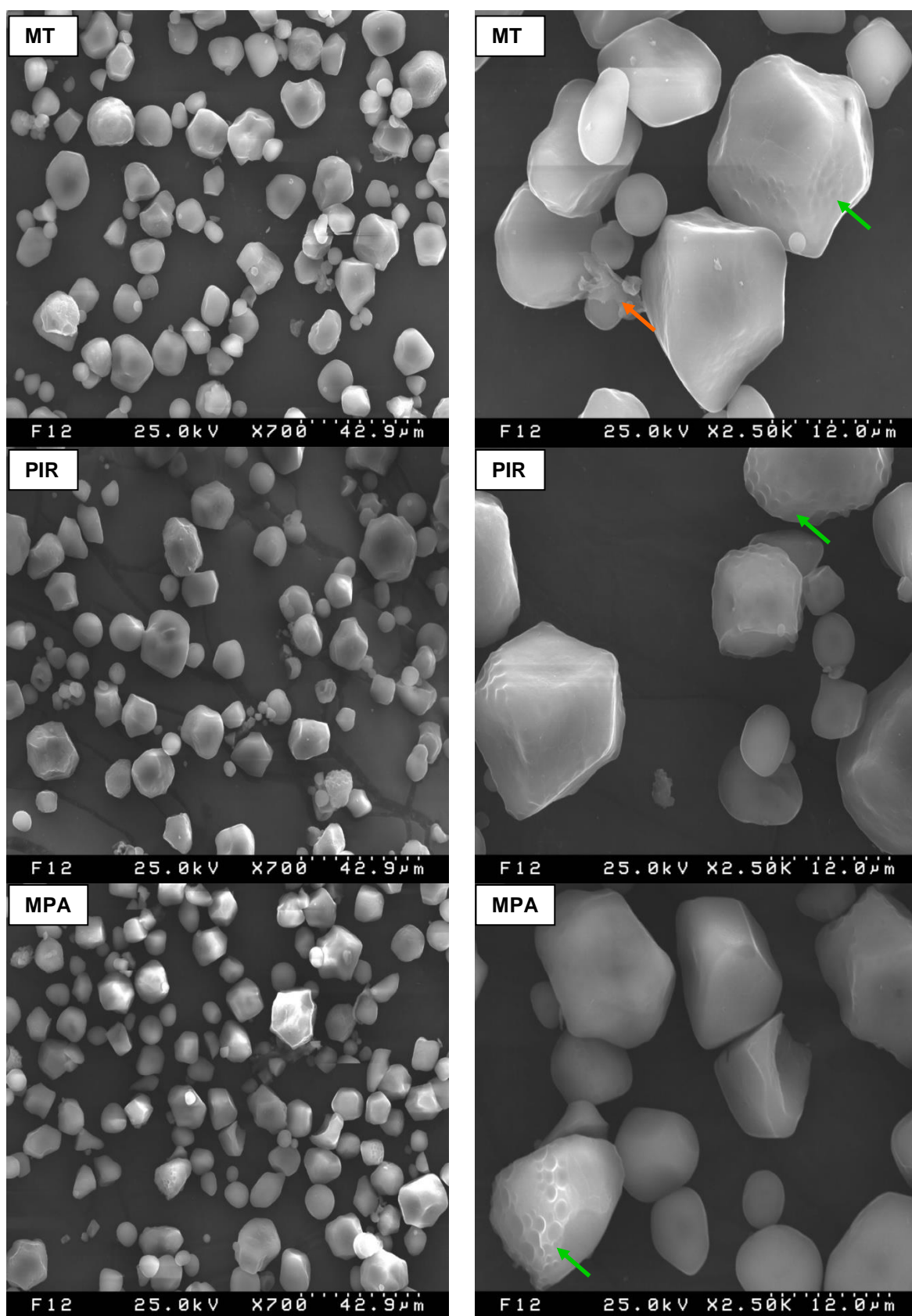
### **2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV)**

A microscopia eletrônica de varrimento (MEV) foi utilizada para caracterizar a morfologia e o tamanho dos grânulos dos amidos em estudo. A Figura 2.5 apresenta as micrografias obtidas com ampliação nas magnitudes de 700 e 2500X.

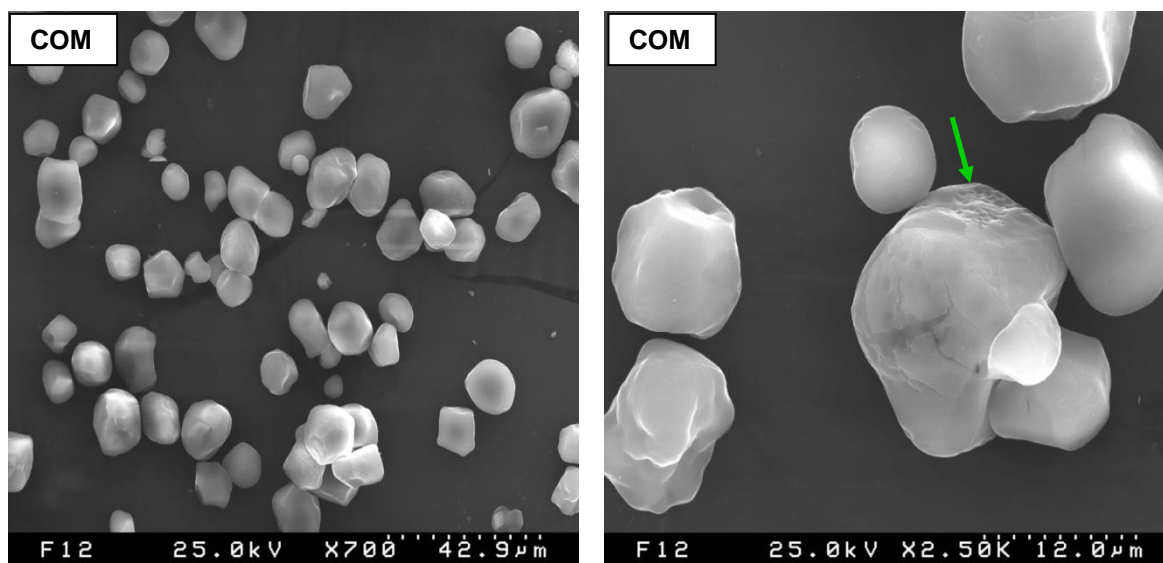




**Figura 2.5:** Micrografias dos amidos obtidas por MEV. Aquisição com 700 e 2500X de magnitude. Depressões ocasionadas pelos corpos proteicos (verde). Deformidades ocasionadas pela compressão granular (azul). Restos de parede celular (laranja).



**Figura 2.5:** Continuação das micrografias obtidas por MEV dos amidos analisados.



**Figura 2.5:** Continuação das micrografias obtidas por MEV dos amidos analisados.

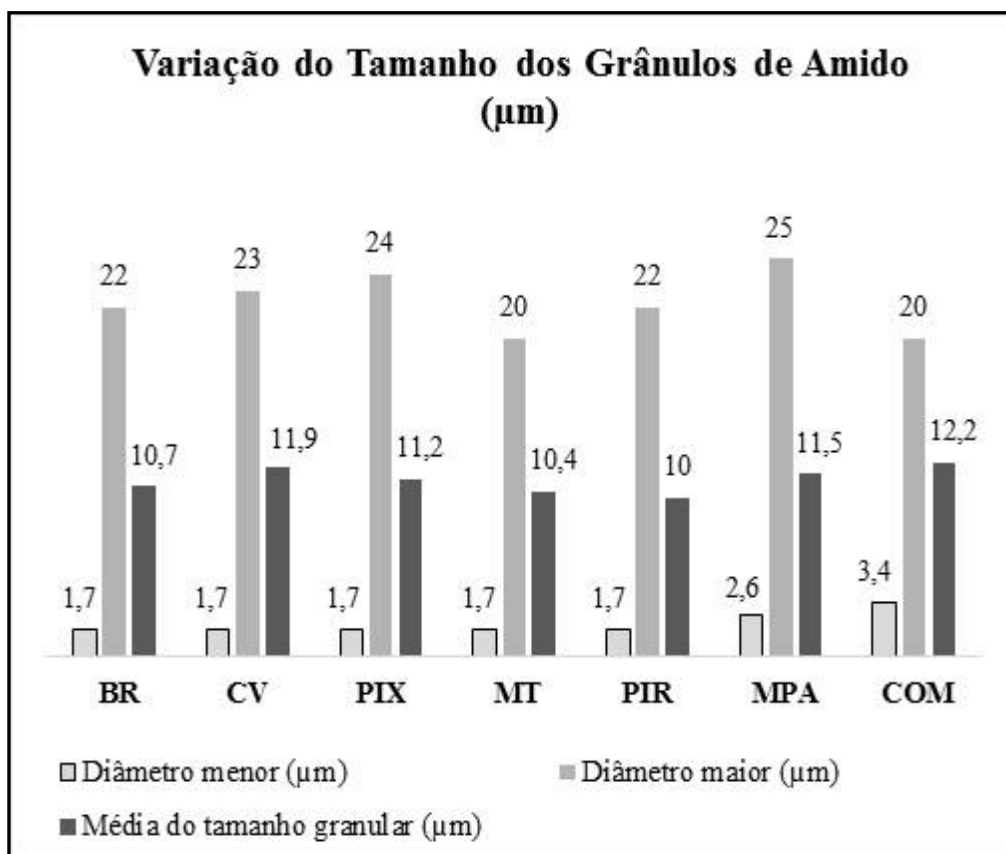
As micrografias adquiridas no MEV, apresentadas na Figura 2.5, mostram as características comumente observadas em amidos de milho. Observa-se principalmente o formato poliédrico (grânulos maiores) e também o formato arredondado (grânulos menores). O mesmo foi reportado por Sandhu *et al.* (2004) para diferentes tipos de amido de milho. Estas observações também estão de acordo com o citado por Hosney (1991) que relata que a forma do grânulo de amido de milho varia desde a forma poliédrica até a quase esférica. O autor cita que os grânulos de amido presentes próximo ao exterior do grão tendem a ser poliédricos e fortemente unidos pela matriz proteica constituindo o endosperma vítreo. Mais no interior do grão de milho os grânulos tendem a ser esféricos constituindo o endosperma opaco. Na região periférica do grão a forma poliédrica dos grânulos de amido deve-se à forte compressão entre eles ao passo que os que se encontram mais no interior do grão apresentam a forma mais esférica devido ao maior espaço existente (Dombrink-Kurtzman e Knutson, 1997). A morfologia apresentada pelos grânulos dos amidos em estudo está de acordo com estas observações, verificando-se (na magnitude de 2500X) que os grânulos poliédricos encontram-se marcados por “depressões” possivelmente resultantes da compressão exercida pelas proteínas de superfície que estavam fortemente aderidas aos grânulos (corpos proteicos) (Figura 2.5). Em comparação com o amido comercial a forma e o aspeto dos amidos crioulos parece demonstrar que estes estavam mais comprimidos e aderidos à matriz proteica (mais poliédricos e com depressões). No amido da variedade CV também foi possível observar

deformidades na superfície dos grânulos ocasionadas pela compressão com grânulos menores. As micrografias eletrônicas também demonstraram a ausência de fibras e a presença de um resquício de parede celular observado na amostra da variedade MT.

Na análise quer dos grânulos dos amidos crioulos quer do amido comercial não foi observada a presença de poros de superfície nas magnitudes utilizadas. Poros ou pequenas aberturas distribuídas pela superfície do grânulo, em diferentes quantidades, foram identificados por Fannon *et al.* (1992) em alguns amidos de milho e sorgo. Estes poros foram considerados como características próprias da estrutura destes grânulos e não artefatos produzidos pelo isolamento. Os referidos autores observaram a existência de grânulos com muitos poros, outros apenas com alguns poros e também grânulos nos quais estes poros não foram visualizados. Em geral, foram observados em grânulos mais esféricos (Fannon *et al.*, 1992; Dombrink-Kurtzman e Knutson, 1997; Li *et al.*, 2001).

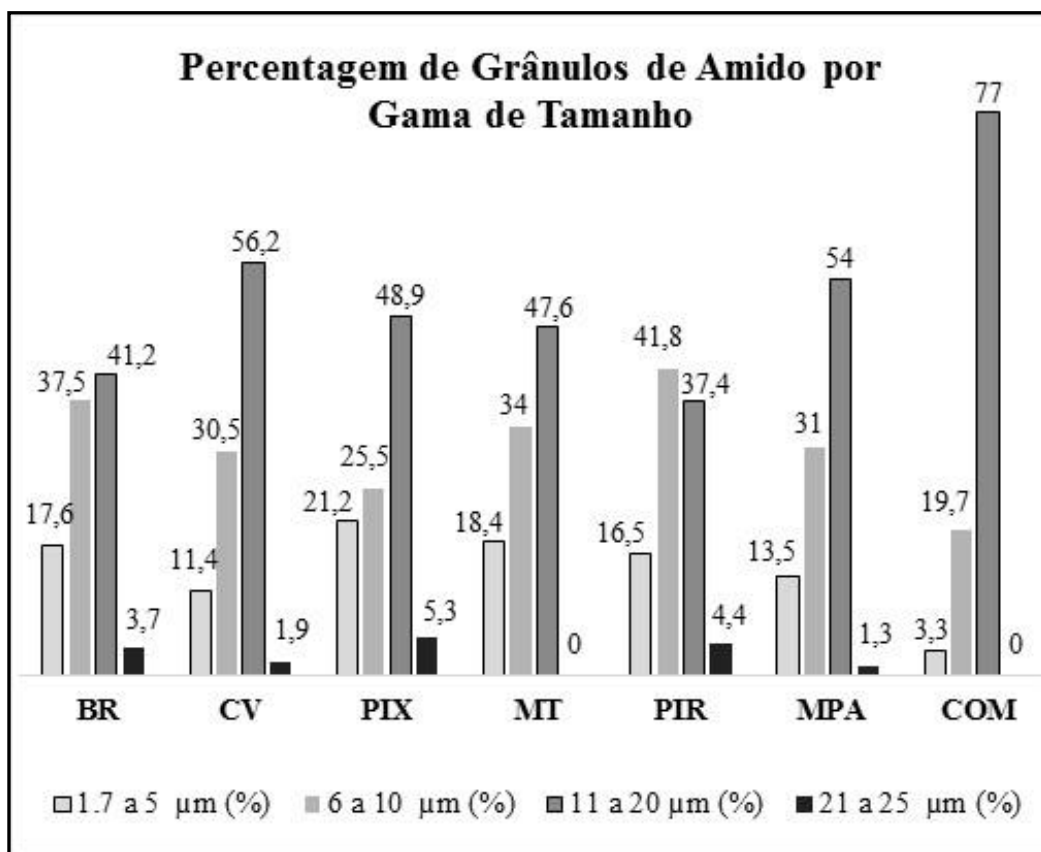
De acordo com o descrito por Matsuguma (2006) a forma e o tamanho dos grânulos variam com o tipo de amido, enquanto a distribuição de tamanho varia com o estágio de desenvolvimento da planta. Daiuto (2005) também relata que a estrutura do amido, por estar ligada ao desenvolvimento da planta, está diretamente relacionada com as condições agronômicas do local em que ocorre o cultivo. Fatores como alterações climáticas (temperatura e chuvas) podem ter influência sobre a forma e o tamanho dos grânulos.

Quanto ao tamanho dos grânulos, verificam-se variações dependendo do tipo de amido, geralmente entre 1 a 100  $\mu\text{m}$  (Tester *et al.*, 2004). Em geral, para grânulos de amido de milho a média do tamanho varia entre 1 a 7  $\mu\text{m}$  para os grânulos pequenos e entre 15 e 20  $\mu\text{m}$  para os grânulos maiores (Singh *et al.*, 2003). No presente trabalho foram identificados grânulos pequenos e grandes em todas as variedades de milho demonstrando heterogeneidade de tamanho. Identificaram-se tamanhos de grânulos entre 1,7 e 25  $\mu\text{m}$  com valores médios entre 10 e 12  $\mu\text{m}$  (Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Variação do tamanho dos grânulos de amido ( $\mu\text{m}$ ). Aproximadamente 100 grânulos de cada amido foram analisados através do programa *ImageJ*.

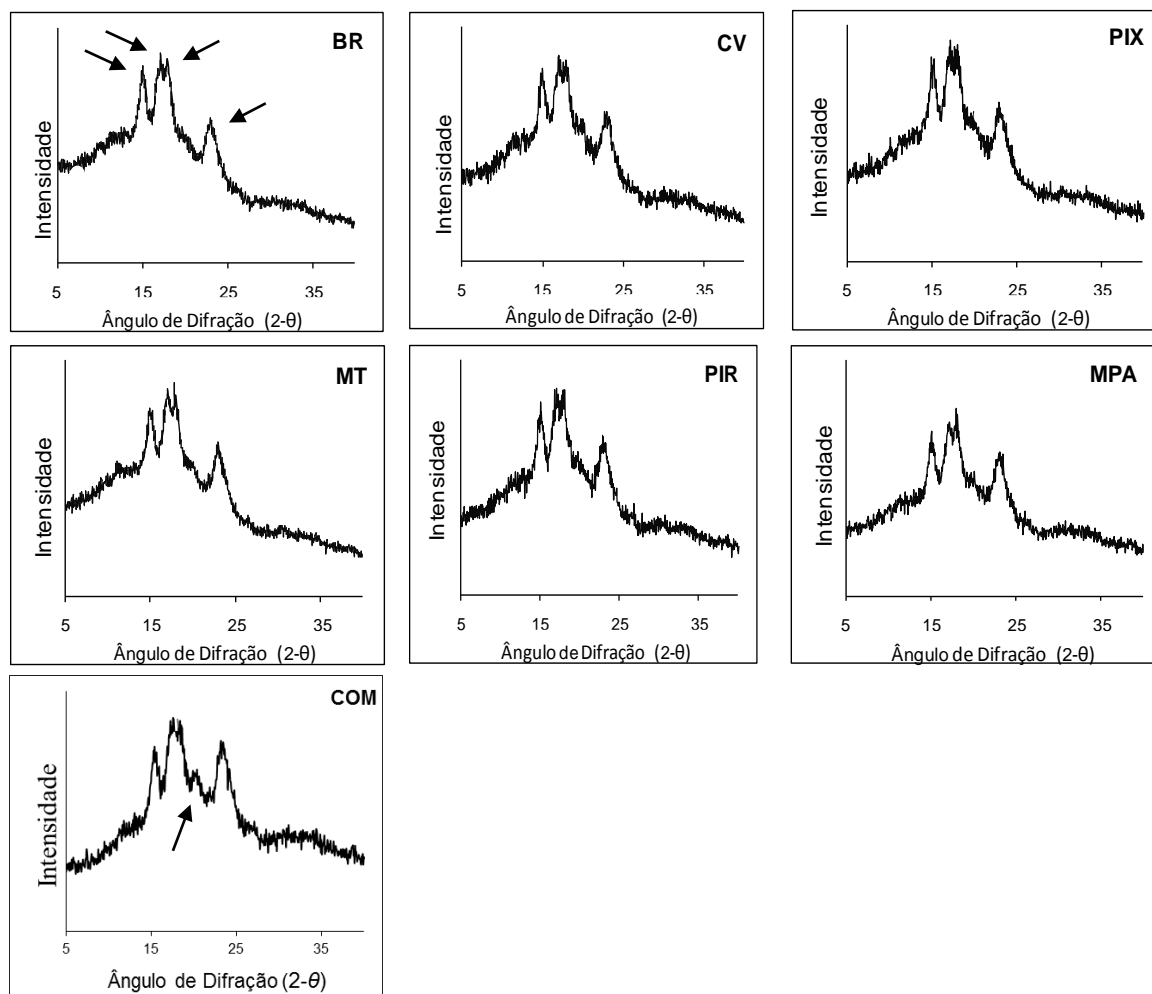
O amido comercial (COM) apresentou somente 3,3% de grânulos entre 1,7 e 5  $\mu\text{m}$  e 77% entre 11 e 20  $\mu\text{m}$  (Figura 2.7). Os amidos crioulos mostraram maior variabilidade no tamanho dos grânulos, apresentando relativa maior proporção de grânulos pequenos e alguma percentagem maior que 20  $\mu\text{m}$ . Dentre os amidos crioulos o da variedade MT foi o único no qual se observaram grânulos somente até 20  $\mu\text{m}$  nas micrografias eletrônicas analisadas. Os amidos das variedades BR, MT e PIR apresentaram mais de 50% de seus grânulos com tamanho até 10  $\mu\text{m}$  e os amidos das variedades CV, PIX e MPA apresentaram mais de 50% de seus grânulos com tamanhos acima de 11  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.7:** Percentagem de grânulo de amido por gama de tamanho. Aproximadamente 100 grânulos de cada amido foram analisados através do programa *ImageJ*.

### 2.3.4 Difração de Raios-X (WAXS)

A cristalinidade, obtida pela difração de raios-X, é um fator de diferenciação entre amidos, pois permite a identificação da natureza botânica, revela a presença e as características da estrutura cristalina, permitindo assim diferenciar a organização ou estrutura dos amidos (Hoover, 2001; White, 2001; Cereda *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009a). Os difratogramas de raios-X dos amidos de milho crioulos e comercial estão apresentados na Figura 2.8, assim como as percentagens de cristalinidade estão apresentadas na Tabela 2.2.



**Figura 2.8:** Difratomogramas dos amidos das diferentes variedades de milho crioulos em estudo e do amido comercial (COM).

Observa-se que os difratogramas de raios-X apresentados demonstraram fortes picos de intensidade de refração para os ângulos a  $2\theta$  em  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18^\circ$  e  $23^\circ$ , indicados na figura. Estes picos são típicos de amidos de cereais e caracterizam os amidos estudados no presente trabalho como padrão tipo A, o que está de acordo com outras pesquisas prévias em amido de milho normal (Becker *et al.*, 2001; Cereda *et al.*, 2002; Tziotis *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006; Huijbrechts *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009b). O pico em  $15^\circ$  é um singuleto, seguido pelo duplete formado pelos picos  $17^\circ$  e  $18^\circ$  e novamente um singuleto em  $23^\circ$ .

Complexos de amilose e lípidos têm sido associados com a formação de um pico adicional localizado em  $2\theta = 20^\circ$  (Singh *et al.*, 2006), já descritos para amidos de

diferentes origens, incluindo cevada (Tang *et al.*, 2000), trigo (Ando *et al.*, 2002) e milho (Singh *et al.*, 2006). No amido comercial (COM) é possível observar um pico de difração a  $2\theta = 20^\circ$  que é indicativo de alguma amilose complexada com lípidos na referida amostra. Nos amidos crioulos não foi observado pico de difração a  $2\theta = 20^\circ$  o que indica a ausência ou quantidade ínfima destes complexos nos amidos crioulos (o que é viável devido aos diferentes métodos de isolamento utilizados entre o amido de procedência comercial e os crioulos). O amido comercial, de fato apresentou uma quantidade ligeiramente mais alta de lípidos que os amidos crioulos (Tabela 2.1).

Na Tabela 2.2 apresentam-se as percentagens de cristalinidade dos amidos das diferentes variedades de milho em estudo, calculados de acordo com a equação 2.1. (item 2.2.2.12). A variação foi entre 18.5% para o amido MT e 25% para o PIR. A ordem crescente de cristalinidade entre os amidos crioulos foi: MT < BR = MPA < PIX < CV < PIR. Estes valores estão de acordo com o descrito na literatura para amidos de milhos nativos como, por exemplo, as percentagens de 17.5%, 27.1% e 28.6% apresentadas nos trabalhos de Huijbrechts *et al.* (2008), Han *et al.* (2009) e Chung *et al.* (2009), respectivamente.

**Tabela 2.2:** Percentagens de cristalinidade dos amidos em estudo.

<b>Amidos</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>
<b>BR</b>	22.0
<b>CV</b>	24.5
<b>PIX</b>	24.0
<b>MT</b>	18.5
<b>PIR</b>	25.0
<b>MPA</b>	22.0
<b>COM</b>	19.0

As diferenças na cristalinidade dos amidos têm sido associadas para além do conteúdo de amilose/amilopectina, também com o comprimento médio das cadeias de amilopectina e com a orientação das duplas hélices (Chung *et al.*, 2009). Quanto ao teor de



amilose pode-se dizer que este parâmetro tem sido negativamente correlacionado com a cristalinidade dos amidos, ou seja, quanto maior o teor de amilose no amido, menor a sua cristalinidade (Tziotis *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006; Huijbrechts *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009b). O comprimento das cadeias de amilopectina assim como a proporção de cadeias maiores ou menores tem demonstrado relação com a cristalinidade do amido. Cadeias de amilopectina mais curtas e a maior quantidade de cadeias curtas presentes no amido têm sido associadas a uma menor cristalinidade (Shi *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2009; Xiao-Peng *et al.*, 2010).

No presente trabalho os amidos são classificados como normais quanto ao teor de amilose e amilopectina, com diferenças mínimas entre eles, sugerindo que outros fatores estruturais estão mais envolvidos com a cristalinidade obtida como, por exemplo, o tamanho e a proporção de tamanho da amilopectina. Sem existir propriamente uma correlação, é de salientar que nos amidos em estudo a cristalinidade é maior quando existem grânulos maiores a 20  $\mu\text{m}$ .

### **2.3.5 Poder de Inchamento dos Grânulos**

Na Figura 2.9 estão apresentados os resultados do poder de inchamento dos amidos de milho em estudo, aquecidos sob duas temperaturas: 65 e 90 °C. Os valores obtidos demonstram o maior poder de inchamento dos grânulos quando a temperatura aumenta de 65 °C para 90 °C, um efeito já esperado e que está de acordo com o descrito noutros trabalhos com amidos (Sasaki e Matsuki, 1998; Li e Yeh, 2001; Lawal *et al.*, 2005 e Xia *et al.*, 2012). O inchamento dos grânulos de amido está relacionado com a rutura parcial das ligações de hidrogénio existentes entre os componentes macromoleculares do amido e com a formação de novas ligações com as moléculas de água, sendo que este processo é facilitado com o aumento da temperatura (Hoover, 2001; Singh *et al.*, 2003).

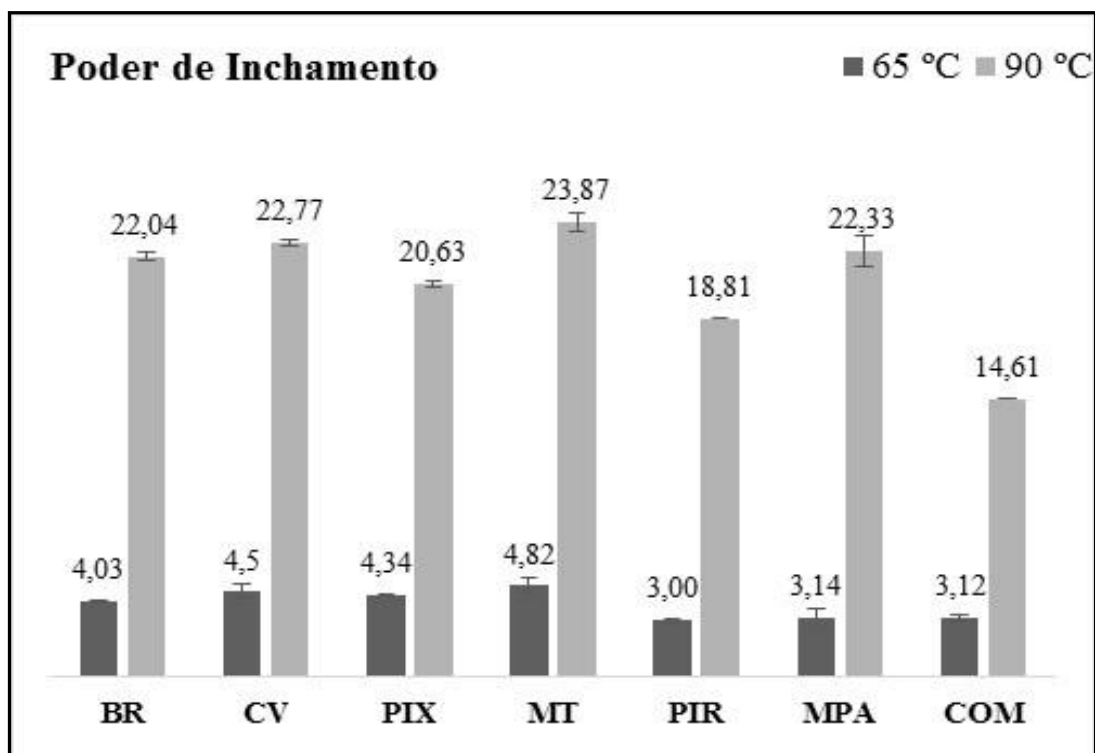


Figura 2.9: Poder de inchamento dos grânulos dos amidos para 65 e 90 °C.

A força do arranjo molecular é que controla o comportamento do amido em água e a região amorfa do grânulo hidrata-se com maior facilidade do que as regiões cristalinas (Svihus *et al.*, 2005). Autores como Tester e Morrison (1990) sugerem que o inchamento é propriedade da amilopectina e que a amilose atua como um solvente. Para além da força do arranjo molecular, diversos fatores estruturais são correlacionados com o inchamento dos grânulos como a proporção de amilose e amilopectina, a massa molecular e distribuição destes polímeros, o grau de ramificação e o comprimento das cadeias da amilopectina para além da conformação destas macromoléculas (Hoover, 2001; Sandhu *et al.*, 2004). Também a cristalinidade, a presença de complexos amilose/lípidos, o teor de danificação e a morfologia dos grânulos são importantes na extensão do inchamento (Morrison, 1995; Tester, 1997; Singh *et al.*, 2003; Lawal *et al.*, 2005).

Foram observadas diferenças no poder de inchamento para os amidos em ambas as temperaturas estudadas, com diferenças mais significativas a 90 °C (principalmente entre os amidos crioulos e o comercial). Entre os amidos crioulos a 65 °C o inchamento foi menor para as variedades PIR e MPA assim como para o amido comercial (COM),

seguidos pelo BR, PIX, CV e MT. A 90 °C a ordem crescente de inchamento dos grânulos dos amidos crioulos foi PIR e PIX seguidos pelo BR, MPA, CV e MT. Em ambas as temperaturas (65 e 90 °C), entre os amidos crioulos, o PIR apresentou o menor poder de inchamento (3,0 e 18,8) e os amidos CV e MT os maiores (4,5 e 22,8; 4,8 e 23,9, respectivamente).

Observou-se uma certa correlação entre o poder de inchamento dos grânulos e a cristalinidade dos mesmos. O amido da variedade PIR, que apresentou o menor poder de inchamento, apresentou a maior cristalinidade (25%), o que demonstra que este amido possui uma estrutura mais organizada, com ligações internas mais fortes, o que dificulta o inchamento. Seria de esperar que o teor de danificação do amido se relacionasse positivamente com o poder de inchamento, devido à destruição das forças que previnem o inchamento em água. No entanto o amido PIR apresentou elevada percentagem de danificação (4.96%) podendo-se assim inferir que este fator não é o de maior influência em relação ao inchamento deste amido nesta análise. De fato, Tester (1997) relata que, mesmo após severa danificação, alguns fatores estruturais previnem a expansão do amido em água, e enfatiza a influência da estrutura da amilopectina, da composição dos grânulos (proporção amilose/amilopectina, proporção de amilose complexada e livre de lípidos), da “perfeição” e da quantidade da parte cristalina (amilopectina), do tamanho dos grânulos e da quantidade de polissacarídeo lixiviado, sobre o poder de inchamento dos grânulos de amido em água. Este mesmo autor observou que para amido de milho normal se verifica pouca alteração no inchamento, mesmo a altos níveis de danificação e altas temperaturas (danificação entre 0.7 e 91% e inchamento de 10 e 16, respectivamente) quando comparado a outros amidos como, por exemplo, amido de arroz (danificação entre 30 e 97% e inchamento de 11 e 44, respectivamente).

O maior poder de inchamento dos grânulos verificado para o amido da variedade MT pode também ser relacionado com a cristalinidade, visto que para este amido a cristalinidade foi a menor (18.5%), demonstrando uma menor estabilidade granular com ligações internas mais fracas e o amido PIR, que apresentou uma cristalinidade de 25%, tem o menor poder de inchamento. Contudo, o amido CV com o segundo maior poder de inchamento apresentou uma cristalinidade de 24.5%. Isto demonstra que os diversos

fatores estruturais anteriormente citados devem afetar o poder de inchamento, de forma conjunta e complexa, dificultando a identificação daqueles fatores que desempenham o papel mais importante.

Com relação à composição dos amidos observou-se tendencialmente uma relação entre os lípidos e o poder de inchamento a 65 °C. Existe uma correlação, com um coeficiente de determinação  $R^2$  de 0,604, entre o teor de lípidos e o poder de inchamento a 65°C, o qual aumenta para 0,987 quando se retiram os amidos PIR e MPA. Já foi referido que os lípidos de superfície inibem o movimento da água para dentro dos grânulos (Morrison, 1995) sendo possível que os lípidos presentes nos amidos possam ter exercido alguma contribuição no poder de inchamento a esta temperatura, visto que os amidos com os maiores teores de lípidos (COM, MPA, PIR e BR) apresentaram o menor poder de inchamento e os amidos com os menores teores (MT, CV e PIX) apresentaram inchamento superior.

Comparando-se o poder de inchamento a 90 °C, observou-se que o amido comercial (COM) tem um poder de inchamento mais baixo (14,6) do que os amidos crioulos. O  $R^2$  da regressão linear entre o teor de lípidos e o poder de inchamento a 90 °C é de 0,786. Este resultado indica que a rutura das ligações de hidrogénio ocorre com maior facilidade nos amidos crioulos quando a temperatura é mais elevada. No caso do amido comercial, que apresenta o teor de lípidos mais alto, o inchamento dos grânulos possivelmente também foi restringido pela presença de complexos amilose/lípidos indicada por difração de raios-X. De fato, é aceite que os lípidos internos (complexos amilose/lípidos) reduzem o poder de inchamento (Morrison, 1995; Tester, 1997) e que a amilose desempenha um papel nesta restrição pelo facto de que o inchamento ocorre mais rapidamente após a amilose ter sido lixiviada e depende da presença de complexos entre a amilose e os lípidos (Singh *et al.*, 2003). Assim, quer fatores estruturais quer os lípidos complexados podem ter influenciado no menor poder de inchamento obtido para o amido comercial comparativamente aos crioulos, a 90 °C.

Diferenças na morfologia dos grânulos de amido estão também associadas com diferenças no poder de inchamento. Na sua revisão, Singh *et al.* (2007) citam trabalhos nos

quais foi observado maior inchamento em amidos com menor teor de amilose e menor tamanho de grânulos. Em amidos de batata foi reportado maior poder de inchamento em grânulos maiores e irregulares ou cuboidais que podem ajudar na imobilização dos componentes do amido dentro do grânulo (Kaur *et al.*, 2002). Tester e Karkalas (1996) não encontraram relação entre o poder de inchamento e o tamanho dos grânulos em amido de aveia, assim como Sasaki e Matsuki (1998) em amidos de trigo. Estes últimos autores citam o trabalho de Kulp (1973) que reporta maior poder de inchamento a 95 °C para grânulos menores de amido de trigo. Assim, pode-se dizer que existem divergências quanto à relação do poder de inchamento com o tamanho dos grânulos. No presente trabalho, os amidos crioulos apresentaram a 90 °C um claro maior poder de inchamento comparativamente ao amido comercial e possuem maior percentagem de grânulos menores em relação a este amido.

### **2.3.6 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)**

As propriedades térmicas que envolvem os processos de gelatinização (2.3.6.1) e retrogradação (2.3.6.2) dos amidos são parâmetros de grande importância visto que com estas informações é possível determinar a funcionalidade de cada amido, direcionando para a sua melhor utilização na indústria de alimentos. A funcionalidade do amido é influenciada por fatores relacionados à composição (proporção amilose/amilopectina, lípidos, proteínas) e à estrutura molecular da amilopectina, diferindo em amidos da mesma origem botânica e principalmente em amidos provenientes de fontes distintas. Quanto à estrutura molecular, o comprimento e distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina, a extensão das ramificações, a arquitetura do grânulo (proporção da região cristalina e amorfa) são os principais fatores estruturais relacionados com as diferentes propriedades funcionais observadas em amidos (Noda *et al.*, 1998; Jane *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2003; Tziotis *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007). Também a forma e distribuição de tamanho dos grânulos são correlacionadas com os parâmetros obtidos através do DSC (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2007).

### 2.3.6.1 Gelatinização dos Amidos

As propriedades de gelatinização dos amidos crioulos e comercial foram estudadas através do DSC e os parâmetros analisados foram: temperatura inicial da transição ( $T_0$ ); temperatura de pico ( $T_p$ ); temperatura de conclusão ( $T_c$ ); entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ); faixa de temperatura de gelatinização ( $R_{gel}$ ) e índice de altura do pico ( $PHI$ ). A Tabela 2.3 apresenta os valores obtidos, que são correspondentes às curvas das transições endotérmicas da gelatinização, dos amidos em suspensão aquosa a 20% (m/m).

**Tabela 2.3:** Propriedades térmicas durante a gelatinização dos amidos crioulos e do amido comercial a 20% (m/m) em água.

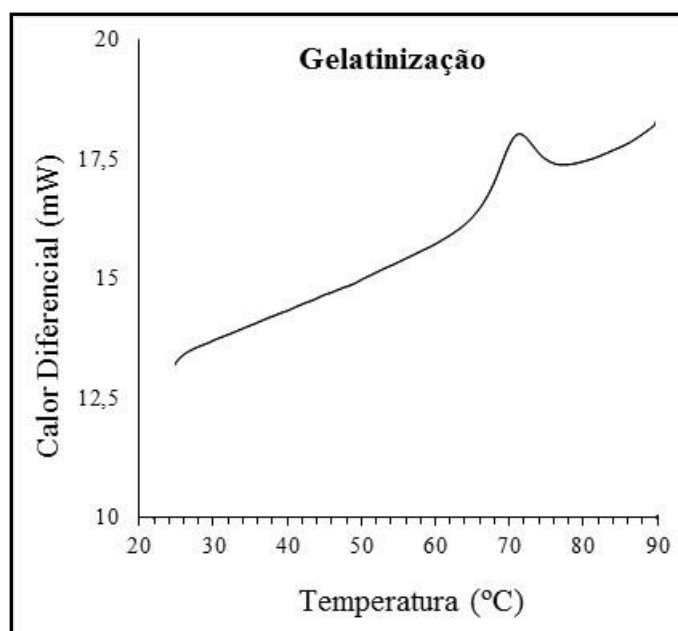
Gelatinização						
	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_{gel}$ (J/g)	$R_{gel}$ (°C)	$PHI$ (Jg <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )
BR	65.2 <sup>d</sup> ± 0.1	70.0 <sup>c</sup> ± 0.0	75.2 <sup>a</sup> ± 0.1	13.2 <sup>c</sup> ± 0.4	9.7 <sup>a</sup> ± 0.1	2.7 <sup>c</sup> ± 0.1
CV	65.1 <sup>d</sup> ± 0.0	71.0 <sup>d</sup> ± 0.0	76.8 <sup>d</sup> ± 0.4	13.2 <sup>c</sup> ± 0.7	11.8 <sup>b</sup> ± 0.0	2.2 <sup>b</sup> ± 0.2
PIX	63.5 <sup>b</sup> ± 0.1	69.5 <sup>b</sup> ± 0.0	75.3 <sup>a</sup> ± 0.1	12.8 <sup>c</sup> ± 0.5	12.0 <sup>b</sup> ± 0.2	2.1 <sup>ab</sup> ± 0.1
MT	61.0 <sup>a</sup> ± 0.1	67.5 <sup>a</sup> ± 0.3	76.6 <sup>cd</sup> ± 0.4	12.4 <sup>bc</sup> ± 0.5	13.1 <sup>c</sup> ± 0.5	1.9 <sup>a</sup> ± 0.1
PIR	63.8 <sup>b</sup> ± 0.2	70.3 <sup>c</sup> ± 0.2	76.0 <sup>b</sup> ± 0.2	13.3 <sup>c</sup> ± 0.6	13.0 <sup>c</sup> ± 0.0	2.0 <sup>ab</sup> ± 0.1
MPA	65.9 <sup>e</sup> ± 0.1	71.7 <sup>e</sup> ± 0.4	76.8 <sup>cd</sup> ± 0.4	11.8 <sup>ab</sup> ± 0.1	11.7 <sup>b</sup> ± 0.9	2.0 <sup>ab</sup> ± 0.2
COM	64.6 <sup>c</sup> ± 0.4	70.3 <sup>c</sup> ± 0.0	75.5 <sup>a</sup> ± 0.2	11.4 <sup>a</sup> ± 0.5	11.5 <sup>b</sup> ± 0.7	2.0 <sup>ab</sup> ± 0.2

$T_0$ : temperatura inicial,  $T_p$ : temperatura de pico,  $T_c$ : temperatura de conclusão,  $\Delta H_{gel}$ : entalpia de gelatinização,  $R_{gel}$ : faixa de gelatinização ( $2(T_p - T_0)$ ) e  $PHI$ : índice de altura de pico ( $\Delta H_{gel} / (T_p - T_0)$ ). Correspondem à média de três valores ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

A temperatura inicial ( $T_0$ ) indica o início do processo de gelatinização do amido. A temperatura de pico ( $T_p$ ) fornece a medida da qualidade cristalina (comprimento das duplas hélices) enquanto a  $\Delta H_{gel}$  fornece uma medida geral da cristalinidade da amilopectina (qualidade e quantidade) e reflete a perda da ordem molecular (duplas

hélices) dentro dos grânulos (Tester e Morrison, 1990; Cooke e Gidley, 1992; Hoover, 2001; Singh *et al.*, 2003). A  $R_{gel}$  sugere a presença de regiões cristalinas com diferentes resistências ou força dentro dos grânulos (Banks e Greenwood, 1975 *apud* Sandhu *et al.*, 2004) e o  $PHI$  reflete a medida da uniformidade na gelatinização (Sandhu e Singh, 2007).

Todos os termogramas resultantes do processo de gelatinização dos amidos apresentaram um pico definido entre aproximadamente 60 e 80 °C (Figura 2.10). Os valores das temperaturas de transição ( $T_0$ ,  $T_p$  e  $T_c$ ) variaram nos amidos crioulos entre 61.0 e 65.9 °C, 67.5 e 71.7 °C e 75.3 e 76.8 °C, respetivamente. As temperaturas de transição obtidas para o amido comercial (COM) encontram-se também nestas gamas, pelo que, generalizando, não se diferenciou dos amidos crioulos quanto às características da transição térmica que acompanha a gelatinização.



**Figura 2.10:** Exemplo de termograma obtido na análise por calorimetria diferencial de varrimento para o amido MPA (gelatinização), a 20% (m/m) de concentração.

O amido crioulo MT foi o que se destacou com os menores valores de  $T_0$  e  $T_p$  (61.0 e 67.5 °C). O início da gelatinização a uma temperatura mais baixa indica que menos energia é necessária para iniciar o processo de gelatinização, uma característica que pode ser desejável para o processamento de alimentos no que diz respeito à conservação de nutrientes e sabor (Tziotis *et al.*, 2005). O amido da variedade crioula MPA foi o que

apresentou os maiores valores de  $T_0$  e  $T_p$  (65.9 e 71.7 °C) indicando a necessidade de maior energia para o início do processo de gelatinização e também maior comprimento das duplas hélices de amilopectina. Os outros amidos apresentaram valores intermediários ao MPA e MT. Em termos da composição dos amidos as proteínas e os lípidos de superfície podem colaborar para a elevação da  $T_0$  (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2007). Já um menor conteúdo de amilose tem sido associado com a diminuição da  $T_0$  (a amilopectina diretamente ligada à cristalinidade tem maior estabilidade estrutural e resistência ao início da gelatinização) (Cooke e Gidley, 1992; Singh *et al.*, 2003). Nos amidos em análise as quantidades destas frações não apresentam diferenças significativas, porém, em conjunto podem ter exercido influência nos resultados de acordo com as informações supracitadas. Entretanto, Noda *et al.* (1998) analisaram as propriedades de gelatinização em 51 amostras de amidos de batata e 27 de trigo com teor de amilose entre 14.2 e 27.4%. Estes autores não encontraram relação entre o conteúdo de amilose e os parâmetros obtidos no DSC, porém observaram que as diferenças nas propriedades funcionais destes amidos estavam ligadas à distribuição das cadeias curtas de amilopectina e não à quantidade de amilose em relação à amilopectina. Em conclusão, os menores parâmetros das análises térmicas foram atribuídos a maior quantidade de amilopectina de cadeias curtas, ou seja, à arquitetura molecular da região cristalina. Em seu artigo de revisão Hoover (2001) também menciona a relação entre os parâmetros obtidos por DSC com a região cristalina correspondendo à distribuição das cadeias curtas (DP 6-11) da amilopectina (menores parâmetros e presença abundante de cadeias curtas de amilopectina) e não com a proporção amilose/amilopectina. Em amidos de milho de genótipos normais e mutantes, Tziotis *et al.* (2005) também encontraram uma relação entre a maior percentagem de cadeias curtas e a menor cristalinidade do amido, resultando em menor  $T_0$ . Esta relação da influência da estrutura molecular da amilopectina sobre as propriedades funcionais dos amidos (maior quantidade de amilopectina com ramificações curtas e menores temperaturas) foi observada em vários trabalhos, em amidos da mesma origem botânica e entre diferentes fontes (Shi e Seib, 1995; Noda *et al.* 1998; Jane *et al.*, 1999; Hoover, 2001; Pantidol e Wang, 2002; Ji *et al.* 2003b; Tziotis *et al.*, 2005). De acordo com Ji *et al.* (2003b),  $T_0 \leq 63$  °C (como a determinada para o amido MT) é uma temperatura inicial de gelatinização menor do que normalmente é encontrada em amidos comuns e relacionou com maiores concentrações de cadeias ramificadas com DP abaixo de 13.



Apesar de não terem sido avaliadas a distribuição e o comprimento das cadeias de amilopectina no presente trabalho, é possível ponderar que as diferentes propriedades funcionais dos amidos crioulos estão também ligadas a estas características estruturais. Como anteriormente mencionado a  $T_p$  está associada ao comprimento das duplas hélices da amilopectina e também foi menor para o amido da variedade MT. Este resultado corrobora também com a menor cristalinidade observada para o amido MT e pode indicar que o menor comprimento das duplas hélices também influencia na menor cristalinidade deste amido. A existência da correlação entre menor  $T_p$  e menor  $T_0$  e vice-versa pode ser observada entre, por exemplo, os amidos das variedades MT e MPA, respectivamente.

A entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ) dos amidos variou entre 11.4 e 13.3 J/g. A ordem crescente das entalpias foi: COM (11.4), MPA (11.8), MT (12.4), PIX (12.8), CV (13.2), BR (13.2) e PIR (13.3). Diferenças na  $\Delta H_{gel}$  relacionam-se com diferenças nas forças de ligação entre as duplas hélices que formam os cristais de amilopectina refletindo, desta maneira, a perda da ordem molecular (duplas hélices) dentro dos grânulos (Tester e Morrison, 1990; Cooke e Gidley, 1992; Singh *et al.*, 2003). Menores  $\Delta H_{gel}$  sugerem uma menor organização dentro dos grânulos ou menor estabilidade dos cristais (Kaur *et al.*, 2004). Assim, quanto maior o  $\Delta H_{gel}$  mais energia é necessária para a rutura da estrutura dos grânulos, resultando na gelatinização do amido. Os valores obtidos para os amidos em estudo estão de acordo com outros previamente encontrados para diferentes amidos de milho (Berke e Glover, 1994; Sandhu e Singh, 2007).

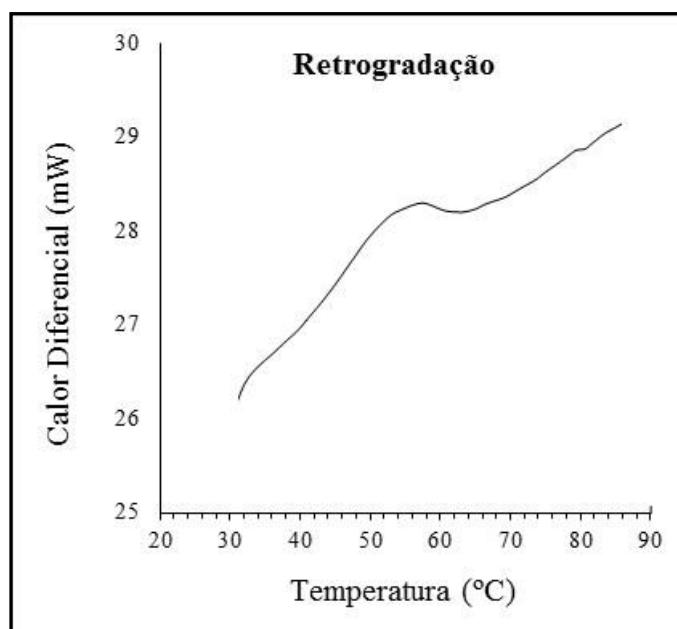
A  $R_{gel}$  variou entre 9.7 °C (BR) e 13.1 °C (MT), o que sugere a presença de cristais com estabilidade diferenciada dentro da zona cristalina, que são rompidos a diferentes temperaturas (Banks e Greenwood, 1975 *apud* Sandhu *et al.*, 2004). Menores  $R_{gel}$  traduzem processos de gelatinização mais rápidos, como é o caso do verificado para o amido da variedade BR. White *et al.* (1990) reportaram  $R_{gel}$  para amidos de milho entre 10.5 e 19.5 °C, Li *et al.* (1994) reportaram  $R_{gel}$  entre 9.8 e 13 °C e Sandhu e Singh (2007) entre 8 e 10 °C, valores da mesma ordem de grandeza dos obtidos neste trabalho. Tziotis *et al.* (2005) descrevem que valores elevados de  $R_{gel}$  podem ser ideais para o processamento de alimentos que requerem vários eventos durante o cozimento do amido porque o sistema alimentar poderia assim manter uma viscosidade consistente e estável ao longo de uma

ampla faixa de temperatura, facto que pode agregar certa vantagem para os amidos MT e PIR neste sentido.

O *PHI* que reflete a uniformidade na gelatinização de cada amido apresentou valores bastante similares com destaque para o amido da variedade BR que apresentou o maior índice (2.7). Sandhu e Singh (2007) reportaram valores de *PHI* para diferentes variedades de milho entre 2.34 e 2.98, concordantes com os valores obtidos neste estudo.

### 2.3.6.2 Retrogradação dos Amidos

A retrogradação dos amidos foi também analisada por DSC, através dos parâmetros que caracterizaram as transições térmicas após armazenamento dos géis a 4 °C durante 7, 14 e 40 dias. As endotermas obtidas no DSC após o armazenamento (a 4 °C) dos amidos gelatinizados foram menos intensas quando comparadas às endotermas da gelatinização (Figura 2.11).



**Figura 2.11:** Exemplo de termograma obtido na análise por calorimetria diferencial de varrimento para o amido MPA (7 dias de retrogradação), a 20% (m/m) de concentração.

Na revisão realizada por Karim *et al.* (2000) sobre os métodos utilizados para o estudo da retrogradação do amido, são reportados trabalhos que indicam que a concentração mínima de 20% de amido é requerida para a observação da retrogradação através do DSC e que em concentrações de amido abaixo de 10% e acima de 80% não se observa retrogradação sob armazenamento a 4 °C (referência na qual foi baseada a escolha da concentração de 20% de amido para as análises térmicas).

Além das temperaturas de transição, de  $\Delta H_{ret}$  e de  $R_{ret}$ , foi calculada a percentagem de retrogradação ( $R$ ); os valores destes parâmetros estão apresentados na Tabela 2.4. Comparadas com as temperaturas de transição obtidas na gelatinização foi observada a diminuição para todos os amidos analisados. Aos 7 dias de armazenamento a  $T_0$  apresentou diminuição entre 21.3 e 26.9 °C, a  $T_p$  reduziu entre 14.1 e 23.1 °C e a  $T_c$  reduziu entre 9.2 e 12.4 °C. Após 14 e 40 dias de armazenamento houve pouca alteração nas temperaturas de transição. Esta diminuição nas temperaturas de transição dos amidos com relação à gelatinização está de acordo com o descrito em outros estudos indicando que a fusão do amido retrogradado ocorre a temperaturas inferiores à gelatinização devido as formas cristalinas que são diferentes das presentes no grânulo de amido nativo (Sandhu e Singh, 2007; Kuakpetoon e Wang, 2007; Karim *et al.*, 2000). Em suma, esta resposta demonstra que durante o armazenamento do amido a baixas temperaturas, as moléculas de amido gelatinizadas reassociam, porém, de uma forma menos ordenada ou estável do que na forma nativa (Cooke e Gidley, 1992).



**Tabela 2.4:** Propriedades térmicas após a retrogradação dos amidos de milhos crioulos e amido comercial a 20% (m/m) em água.

	Retrogradação (7 dias)						Retrogradação (14 dias)						Retrogradação (40 dias)					
	$T_0$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H_{ret}$	$R_{ret}$	$R$	$T_0$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H_{ret}$	$R_{ret}$	$R$	$T_0$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H_{ret}$	$R_{ret}$	$R$
	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(%)
<b>BR</b>	39.4 <sup>a</sup>	55.1 <sup>b</sup>	66.0 <sup>c</sup>	7.4 <sup>bc</sup>	31.3 <sup>e</sup>	56.1 <sup>a</sup>	37.3 <sup>a</sup>	52.9 <sup>ab</sup>	64.4 <sup>abc</sup>	7.6 <sup>b</sup>	31.1 <sup>d</sup>	57.7 <sup>a</sup>	40.5 <sup>a</sup>	54.0 <sup>bc</sup>	64.6 <sup>b</sup>	9.2 <sup>b</sup>	27.1 <sup>d</sup>	69.8 <sup>a</sup>
	±0.1	±0.2	±0.2	±0.2	±0.3	±0.2	±0.5	±0.4	±0.1	±0.4	±0.3	±4.0	±0.7	±0.6	±0.0	±0.0	±0.1	±2.2
<b>CV</b>	40.4 <sup>b</sup>	54.3 <sup>ab</sup>	64.6 <sup>ab</sup>	6.9 <sup>b</sup>	27.8 <sup>bc</sup>	51.8 <sup>a</sup>	39.6 <sup>c</sup>	53.8 <sup>c</sup>	64.8 <sup>bcd</sup>	7.8 <sup>bc</sup>	28.3 <sup>c</sup>	58.9 <sup>a</sup>	40.6 <sup>a</sup>	53.9 <sup>bc</sup>	66.3 <sup>c</sup>	9.9 <sup>cd</sup>	26.5 <sup>cd</sup>	74.8 <sup>b</sup>
	±1.7	±1.4	±1.7	±0.6	±0.6	±1.4	±0.1	±0.6	±0.1	±0.1	±1.3	±3.5	±0.1	±0.7	±1.2	±0.1	±1.6	±3.6
<b>PIX</b>	42.2 <sup>c</sup>	53.3 <sup>a</sup>	68.0 <sup>d</sup>	6.8 <sup>ab</sup>	22.2 <sup>a</sup>	52.6 <sup>a</sup>	38.5 <sup>b</sup>	53.9 <sup>c</sup>	65.1 <sup>d</sup>	9.2 <sup>e</sup>	30.9 <sup>d</sup>	71.6 <sup>b</sup>	40.8 <sup>ab</sup>	53.4 <sup>ab</sup>	64.5 <sup>ab</sup>	9.4 <sup>bc</sup>	25.1 <sup>ab</sup>	73.0 <sup>ab</sup>
	±0.6	±0.2	±0.1	±0.8	±0.8	±3.8	±0.4	±0.7	±0.1	±0.1	±0.7	±2.4	±0.1	±0.2	±0.4	±0.7	±0.1	±2.3
<b>MT</b>	38.2 <sup>a</sup>	53.4 <sup>a</sup>	64.2 <sup>a</sup>	7.0 <sup>bc</sup>	30.5 <sup>de</sup>	55.9 <sup>a</sup>	39.6 <sup>c</sup>	54.1 <sup>c</sup>	64.1 <sup>a</sup>	8.8 <sup>d</sup>	29.0 <sup>c</sup>	71.1 <sup>b</sup>	41.3 <sup>bc</sup>	53.5 <sup>abc</sup>	64.4 <sup>ab</sup>	8.9 <sup>b</sup>	24.5 <sup>a</sup>	71.5 <sup>ab</sup>
	±0.8	±0.2	±0.3	±0.7	±1.1	±3.0	±0.1	±0.2	±0.4	±0.1	±0.2	±2.1	±0.2	±0.1	±0.2	±0.2	±0.7	±2.5
<b>PIR</b>	40.3 <sup>b</sup>	53.9 <sup>a</sup>	66.1 <sup>c</sup>	7.1 <sup>bc</sup>	27.2 <sup>b</sup>	53.3 <sup>a</sup>	38.8 <sup>b</sup>	53.5 <sup>bc</sup>	64.9 <sup>cd</sup>	7.9 <sup>c</sup>	29.5 <sup>c</sup>	59.5 <sup>a</sup>	40.8 <sup>ab</sup>	53.7 <sup>bc</sup>	64.5 <sup>ab</sup>	10.0 <sup>d</sup>	25.8 <sup>bc</sup>	75.2 <sup>b</sup>
	±0.7	±0.0	±0.2	±0.6	±1.4	±2.1	±0.1	±0.1	±0.4	±0.0	±0.1	±2.7	±0.3	±0.1	±0.1	±0.3	±0.6	±1.2
<b>MPA</b>	39.0 <sup>ab</sup>	53.7 <sup>a</sup>	65.4 <sup>bc</sup>	7.9 <sup>c</sup>	29.4 <sup>d</sup>	66.8 <sup>b</sup>	40.6 <sup>d</sup>	53.5 <sup>bc</sup>	64.2 <sup>ab</sup>	8.6 <sup>d</sup>	25.7 <sup>b</sup>	72.8 <sup>b</sup>	40.7 <sup>a</sup>	53.0 <sup>a</sup>	64.3 <sup>ab</sup>	9.7 <sup>cd</sup>	24.6 <sup>a</sup>	82.1 <sup>c</sup>
	±1.0	±0.6	±0.4	±0.2	±0.8	±1.0	±0.6	±0.2	±0.5	±0.1	±0.9	±0.2	±0.2	±0.2	±0.6	±0.2	±0.0	±1.7
<b>COM</b>	39.5 <sup>ab</sup>	54.0 <sup>ab</sup>	63.6 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>	29.1 <sup>cd</sup>	51.5 <sup>a</sup>	41.7 <sup>e</sup>	52.5 <sup>a</sup>	64.4 <sup>abc</sup>	6.4 <sup>a</sup>	21.6 <sup>a</sup>	55.8 <sup>a</sup>	41.8 <sup>c</sup>	54.1 <sup>c</sup>	63.6 <sup>a</sup>	8.3 <sup>a</sup>	24.5 <sup>a</sup>	72.4 <sup>ab</sup>
	±0.6	±0.6	±0.0	±0.3	±0.1	±4.5	±0.1	±0.0	±0.5	±0.1	±0.2	±2.0	±0.3	±0.3	±0.4	±0.3	±1.6	±1.0

$T_0$ : temperatura inicial,  $T_p$ : temperatura de pico,  $T_c$ : temperatura de conclusão,  $\Delta H_{ret}$ : entalpia de retrogradação,  $R_{ret}$ : faixa de retrogradação ( $2(T_p - T_0)$ ),  $R$ : percentagem de retrogradação ( $\Delta H_{ret} / \Delta H_{gel}$ ). Correspondem à média de três valores  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .



As entalpias de retrogradação dos amidos também diminuíram em comparação com as obtidas durante a gelatinização. De acordo com Sasaki *et al.* (2000) estes valores menores obtidos através do DSC são devido a menor cristalinidade apresentada pelos amidos já gelatinizados. Esta diminuição variou entre 51.7% e 66.9% (7 dias) sendo quantificadas entre 5.9 J/g (COM) e 7.9 J/g (MPA). Em geral, as entalpias de retrogradação do amido são de 60 a 80% menores que as entalpias do processo de gelatinização (< 8 J/g) (Karim *et al.*, 2000). Durante o armazenamento a 4 °C as entalpias de retrogradação foram aumentando até os 40 dias para todos os amidos analisados, indicando a ocorrência de reorganização molecular durante este período (maiores entalpias aos 40 dias).

Karim *et al.* (2000) também reportam que a faixa de temperatura de retrogradação ( $R_{ret}$ ) é mais ampla do que a de gelatinização o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Da gelatinização para os 7 dias de retrogradação a faixa de temperatura de retrogradação teve um aumento médio de 16 °C (menor para o amido PIX com 10.2 °C a mais do que na gelatinização e maior para o amido BR com 21.6 °C a mais do que o necessário durante a gelatinização). Comparando-se a  $R_{ret}$  de 7 com 14 dias ocorreu pouca variação com exceção para o amido PIX que aumentou de 22.2 °C para 30.9 °C e para o amido COM que diminuiu de 29.1 °C para 21.6 °C após os 14 dias. Já na comparação da  $R_{ret}$  de 14 para 40 dias houve decréscimo para todos os amidos provenientes das variedades crioulas e somente o amido comercial (COM) aumentou a faixa de temperatura de 21.6 °C para 24.5 °C.

A  $R$  é a percentagem de retrogradação do amido gelatinizado. Para todos os amidos observou-se um aumento gradual, porém diferenciado, da retrogradação até os 40 dias. Após 7 dias a 4 °C os valores obtidos para os amidos crioulos variaram entre aproximadamente 52% e 56%, com exceção do amido MPA que obteve a maior percentagem de retrogradação (66.8%), enquanto o amido comercial (COM) retrogradou 51.5%, valores que são concordantes com outros trabalhos já descritos anteriormente (Sandhu e Singh, 2007).

Após os 14 dias (comparando-se com os 7 dias) o amido BR teve 1.6% de aumento na retrogradação. Os amidos CV, PIR, MPA e COM aumentaram 7.1%, 6.2%,

6% e 4.3% respectivamente enquanto os amidos PIX e MT retrogradaram 19% e 15.2% a mais em relação aos 7 dias. Aos 40 dias todos os amidos analisados apresentaram uma retrogradação entre aproximadamente 70% e 75% com exceção do amido MPA que retrogradou 82.1%. Quanto menor a percentagem de retrogradação mais estável é o amido gelatinizado. Em suma, observou-se que após 7 dias os amidos crioulos apresentaram retrogradação média de 54% comparáveis com o amido comercial (COM) que apresentou 51.5% de retrogradação. O amido MPA foi o menos estável com 66.8% de retrogradação. Após os 14 dias apenas os amidos PIX, MT e MPA tiveram uma média de 70% de retrogradação sendo os amidos restantes os mais estáveis até 2 semanas de armazenamento. Aos 40 dias a média de retrogradação dos amidos crioulos foi ao redor de 73% comparáveis aos 72.4% do amido comercial, com menor estabilidade verificada para o amido MPA (82.1%).

De acordo com os resultados obtidos, em relação à retrogradação, o amido da variedade MPA apresentou a maior percentagem de retrogradação quer após os 7 dias quer após os 14 e 40 dias de armazenamento a 4 °C. As percentagens de retrogradação observadas para os amidos, assim como na gelatinização, também são influenciadas por diferenças estruturais, nomeadamente por variações na distribuição do tamanho das cadeias de amilopectina, havendo relação entre uma maior proporção de cadeias longas em suas ramificações com uma maior facilidade à retrogradação (Jane *et al.*, 1999). No presente trabalho, encontrou-se que existe tendencialmente uma correlação entre a percentagem de retrogradação com os valores de  $T_p$ , os quais são indicativos do comprimento das cadeias de amilopectina. Würsch e Gumy (1994) também observaram que a maior proporção de cadeias curtas de amilopectina com DPs de 6 a 9 inibiu a retrogradação por dificultar a reassociação das cadeias longas.

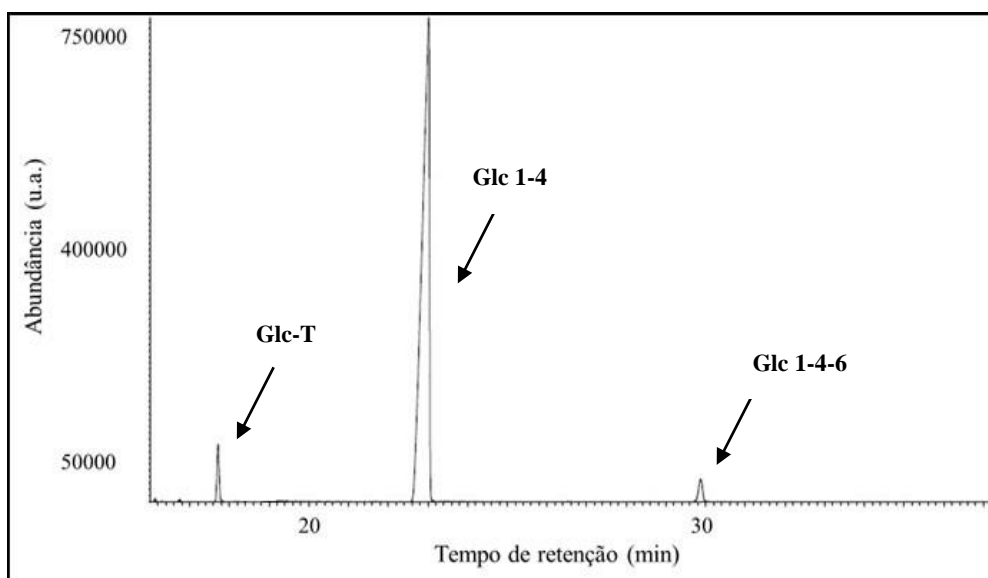
Através dos dados fornecidos pelas análises térmicas pode-se direcionar estas matérias-primas para usos diferenciados na indústria alimentícia, sendo os amidos que apresentam maior percentagem de retrogradação os menos indicados para produtos alimentares que necessitam de armazenamento sob refrigeração e vice-versa.



### **2.3.7 Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS): Análise das Ligações Glucosídicas**

Através da referida análise associada à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foi possível a identificação das ligações glucosídicas que formam a estrutura do amido, permitindo desta forma a verificação da percentagem de ramificação existente nos amidos das variedades de milho em estudo.

A Figura 2.12 exemplifica os cromatogramas nos quais foi observada a presença de três picos de interesse utilizados para esta determinação. Nos cromatogramas obtidos por GC-MS os picos identificados como Glc 1-4 são referentes às ligações entre o carbono 1 de uma glucose e o carbono 4 de outra glucose, ou seja, correspondem as ligações 1-4 entre unidades de glucose das cadeias lineares. Os picos identificados como Glc 1-4-6 correspondem as ramificações e são referentes às ligações entre o carbono 1 de uma glucose e o carbono 6 de outra glucose. Os resíduos terminais tiveram um tempo de retenção de  $\approx 18$  min, seguidos pelos picos referentes às ligações 1-4 com tempo de retenção de  $\approx 23$  min e pelos picos referentes às ligações 1-4-6 com tempo de retenção de  $\approx 30$  min. De acordo com o esperado, observou-se maioritariamente a existência das ligações glucosídicas 1-4 presentes quer na amilose quer na amilopectina.



**Figura 2.12:** Exemplo dos cromatogramas obtidos por GC-MS dos amidos demonstrando os tempos de retenção (amido CV).

Na Tabela 2.5 estão apresentados os resultados da análise estrutural dos amidos pela GC-MS. A análise foi realizada quer para amidos “in natura” quer para amidos pré-gelatinizados. Com o intuito de verificar se não estava a ocorrer dificuldade de metilação nos amidos, questionada devido aos baixos valores obtidos nos amidos “in natura”, gelatinizou-se as amostras intensificando e repetindo a etapa da metilação. Como é possível observar a percentagem de ramificação foi maior para os amidos gelatinizados e remetilados (exceção do COM) demonstrando que estava a ocorrer sub-metilação. Assim, verificou-se ser mais eficaz a aplicação da metodologia nas amostras já gelatinizadas e conforme descrito no item 2.2.2.14.

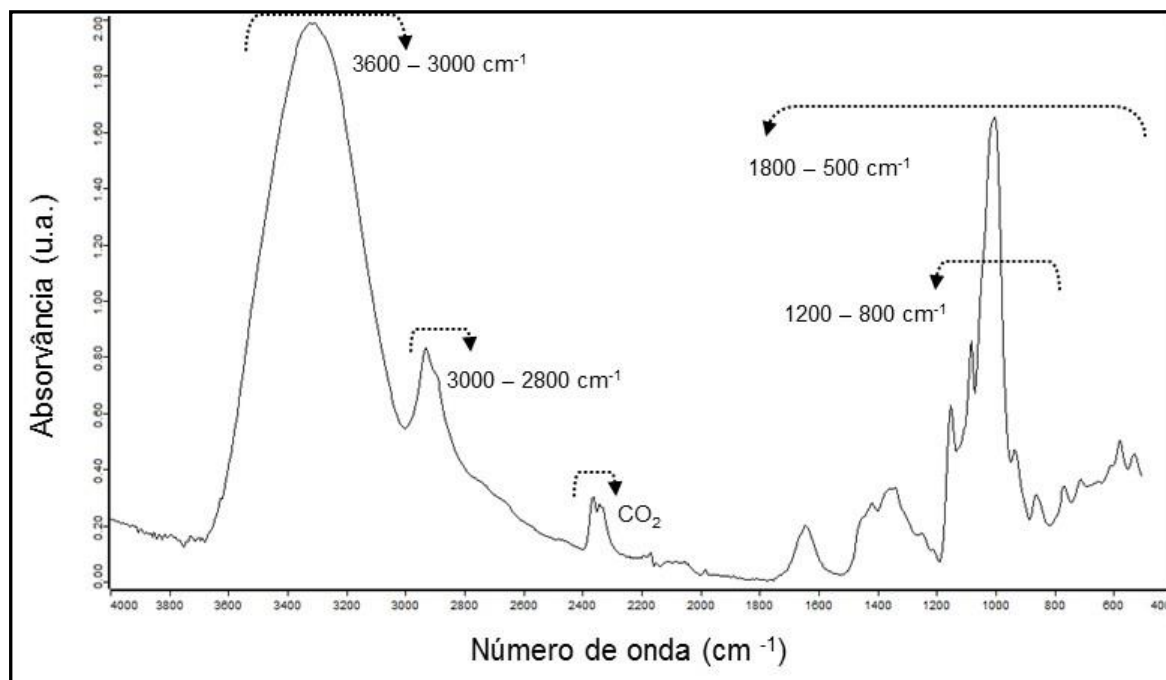
Os resultados obtidos demonstram que os amidos apresentam percentagem de ramificação entre 4 e 5%. De acordo com a literatura, em geral, os amidos apresentam entre 4 a 6% de ramificações (Denardin e Silva, 2009). Desta forma, entre as variedades crioulas em termos de percentagens de ramificações os amidos estudados são bastante semelhantes.

**Tabela 2.5:** Análise estrutural dos amidos crioulos e do amido comercial por GC-MS.

	% Ramificação	
	Amidos “in natura”	Amidos gelatinizados
<b>BR</b>	3	4
<b>CV</b>	2	5
<b>PIX</b>	1	5
<b>MT</b>	1	5
<b>PIR</b>	2	5
<b>MPA</b>	3	5
<b>COM</b>	4	4

### 2.3.8 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR) e Quimiometria

No presente trabalho, utilizou-se a região de infravermelho médio (MID-IR) entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$  e o perfil espectral do amido está apresentado na Figura 2.13.

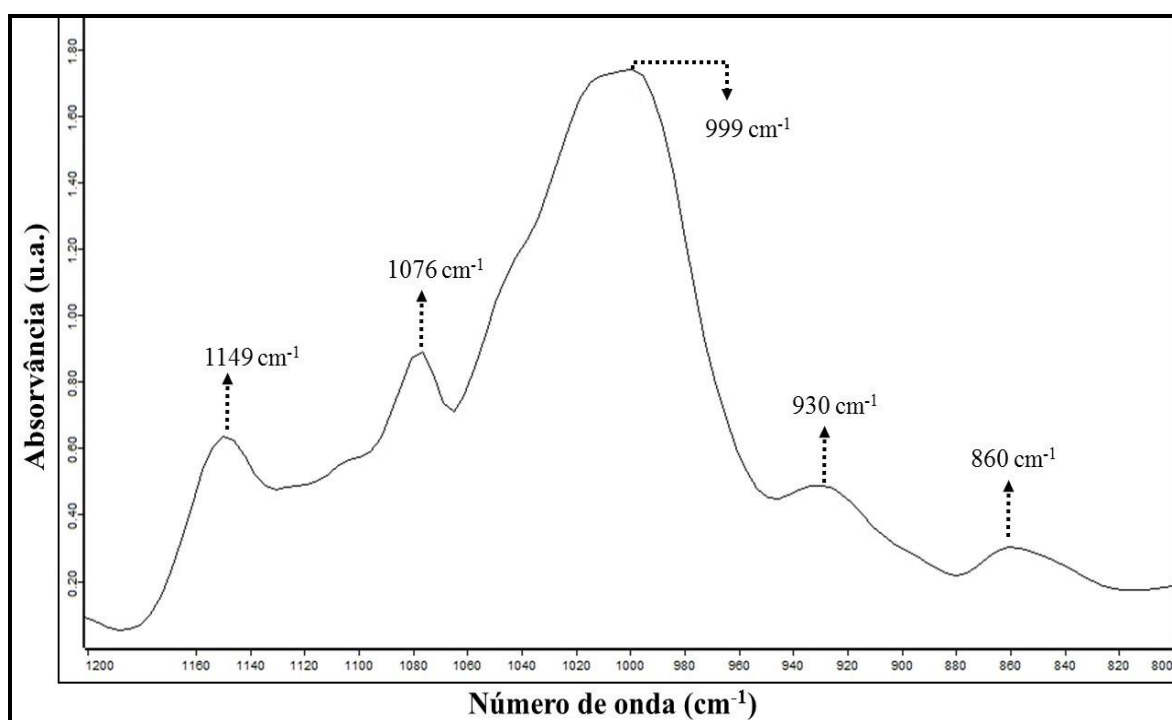


**Figura 2.13:** Perfil de um espectro típico de MID-IR do amido (MPA) de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . Média de 8 réplicas (OPUS 5.0®).

Os espectros dos amidos dos diferentes milhos crioulos e do amido comercial são basicamente iguais, não existindo diferenças que permitam os distinguir visualmente uns dos outros. O espectro da Figura 2.13 apresenta um espectro típico, com uma banda larga na região entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  correspondente aos estiramentos dos grupos hidroxilo do amido (O-H) e das moléculas de água presente. A banda entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos estiramentos das ligações C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  (van Soest *et al.*, 1995). A banda entre 2400 e 2300  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao  $\text{CO}_2$  atmosférico e, portanto, não é uma banda correlacionada com a composição ou estrutura do amido.

Genericamente, na região abaixo de  $1800\text{ cm}^{-1}$ , aparecem os sinais que se relacionam com lípidos, proteínas e polissacarídeos. O espectro dos lípidos, na zona entre  $1750$  e  $1710\text{ cm}^{-1}$ , deverá estar dominado pelos sinais dos grupos  $\text{C}=\text{O}$  das ligações éster dos ácidos gordos (Schulz e Baranska, 2007). Também podem aparecer bandas menores a  $1670$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$  correspondentes às duplas ligações ( $\text{C}=\text{C}$ ), assim como as deformações do ( $\text{CH}_2$ ) a  $1444\text{ cm}^{-1}$ . As bandas originadas pelas proteínas aparecem entre  $1685$  e  $1480\text{ cm}^{-1}$ . Uma banda centrada em  $1650\text{ cm}^{-1}$  refere-se à amida I e a de  $1543$  a  $1480\text{ cm}^{-1}$  refere-se à amida II. O espectro da Figura 2.13 não apresenta bandas correspondentes a lípidos ou a amida II o que está de acordo com a existência de quantidades mínimas quer de lípidos quer de proteínas nas amostras. Existe uma banda a  $1643\text{ cm}^{-1}$  a qual corresponde à flexão da molécula de água que varia em intensidade em função da quantidade de água que permanece associada ao amido. Esta banda se sobrepõe normalmente à banda da amida I. Neste caso esta banda pode ser assignada apenas à presença de água.

Na região abaixo de  $1200\text{ cm}^{-1}$  as bandas são geralmente características da molécula ou sistema em questão e mesmo moléculas muito semelhantes apresentam diferenças nesta região do espectro sendo por isto conhecida como região da impressão digital ou *fingerprint*. A região de maior interesse neste trabalho está localizada entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$  e relaciona-se com a absorção de hidratos de carbono (Figura 2.14) (Sevenou *et al.*, 2002; Cerná *et al.*, 2003; Copíková *et al.*, 2006), ou seja, é onde encontram-se as bandas características do amido (amilose e amilopectina).

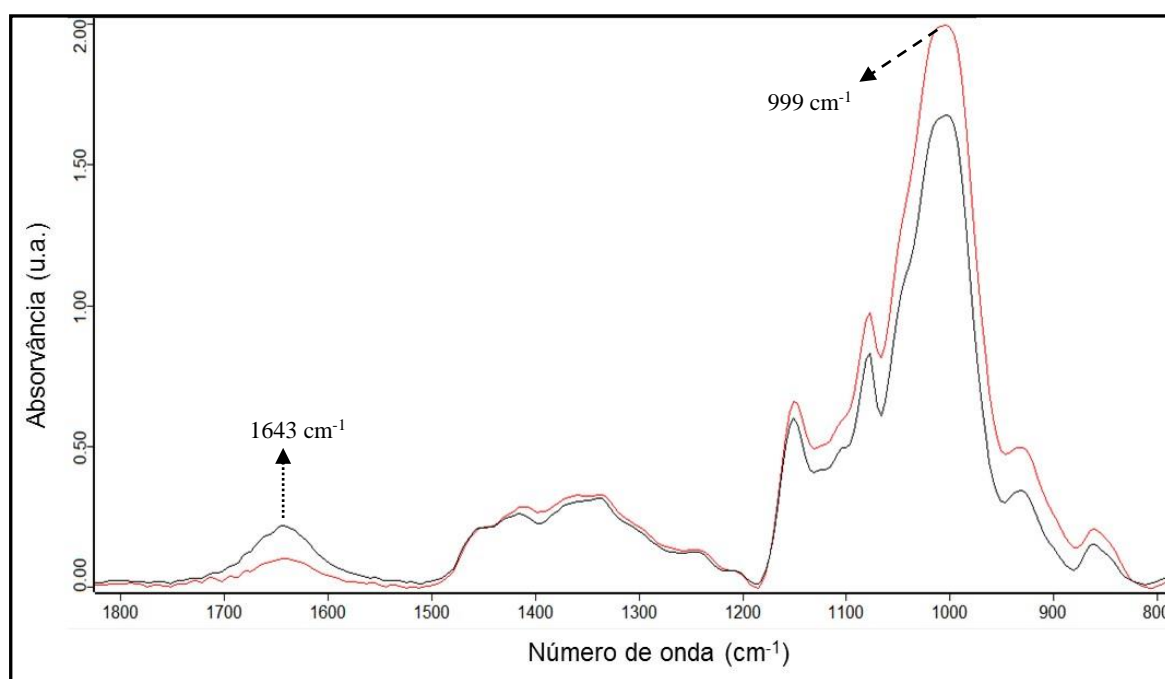


**Figura 2.14:** Perfil de um espectro típico de MID-IR do amido de milho (MPA), com ampliação da região correspondente à zona do *fingerprint* (1200 a 800  $\text{cm}^{-1}$ ). Média de 8 réplicas (OPUS 5.0®).

As bandas a 1149  $\text{cm}^{-1}$  e 1076  $\text{cm}^{-1}$  estão associadas à deformação axial de ligações C-O, C-C e C-O-C (ligação glucosídica) (Lambert *et al.*, 2001). As bandas  $\approx$  a 1000  $\text{cm}^{-1}$  foram identificadas como sensíveis à presença de água e relacionadas às ligações intramoleculares de hidrogénio dos grupos hidroxilo (O-H) (van Soest *et al.*, 1995). As bandas a 930  $\text{cm}^{-1}$  são relacionadas a deformações de C-H do carbono anomérico  $\alpha$  da D-glucose (Lambert *et al.*, 2001), para além de serem atribuídas as ligações glucosídicas do amido (C-O-C) (Kizil *et al.*, 2002). Ao estudar diferentes tipos de amido estes autores observaram mudança na localização e intensidade a 930  $\text{cm}^{-1}$  e atribuíram a mudança para maiores números de onda devido à presença de ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina. As bandas a 860  $\text{cm}^{-1}$  também são relacionadas à deformação de ligações C-H (carbono anomérico  $\alpha$  da D-glucose) (Lambert *et al.*, 2001).

Numa tentativa de verificar a reprodutibilidade dos espectros a análise visual permitiu observar variações consistentes entre as réplicas em todas as amostras. O pico a 1643  $\text{cm}^{-1}$  é menor nos primeiros espectros adquiridos e vai aumentando com o tempo e,

simultaneamente, a banda a  $999\text{ cm}^{-1}$  vai diminuindo em intensidade. Esta característica foi identificada e atribuída à absorção de humidade pelo amido durante a aquisição dos espectros. Desta forma se verifica que quanto mais seca a amostra (primeiros espectros) menor a intensidade em  $1643\text{ cm}^{-1}$  e maior na região próxima a  $999\text{ cm}^{-1}$  (Figura 2.15). Os amidos sofreram influência da humidade presente na sala de análise e o equilíbrio em relação ao ambiente foi alcançado somente entre a 6ª e 8ª réplica (sendo, assim, os 3 últimos espectros os mais homogêneos).



**Figura 2.15:** Exemplo da relação inversa entre as bandas a  $1643\text{ cm}^{-1}$  e a  $999\text{ cm}^{-1}$ . Espectro do amido MPA normalizado e com correção de linha de base (OPUS 5.0®).

— 1º espectro  
— 8º espectro

Para além da relação inversa entre as bandas a  $1643\text{ cm}^{-1}$  e  $999\text{ cm}^{-1}$  observou-se também que conforme o grânulo foi absorvendo humidade do meio ambiente a banda centrada a  $3300\text{ cm}^{-1}$  também aumentou em intensidade e passou a ser dominante nos últimos espectros adquiridos. A Tabela 2.6 apresenta a intensidade máxima de absorvância nestas regiões espectrais ( $3300$ ,  $1643$  e  $999\text{ cm}^{-1}$ ), nos espectros normalizados a 1. Pode-se observar as mudanças que ocorreram nas intensidades.

**Tabela 2.6:** Intensidade máxima de absorvância nas regiões espectrais de 3300, 1643 e 999  $\text{cm}^{-1}$ .

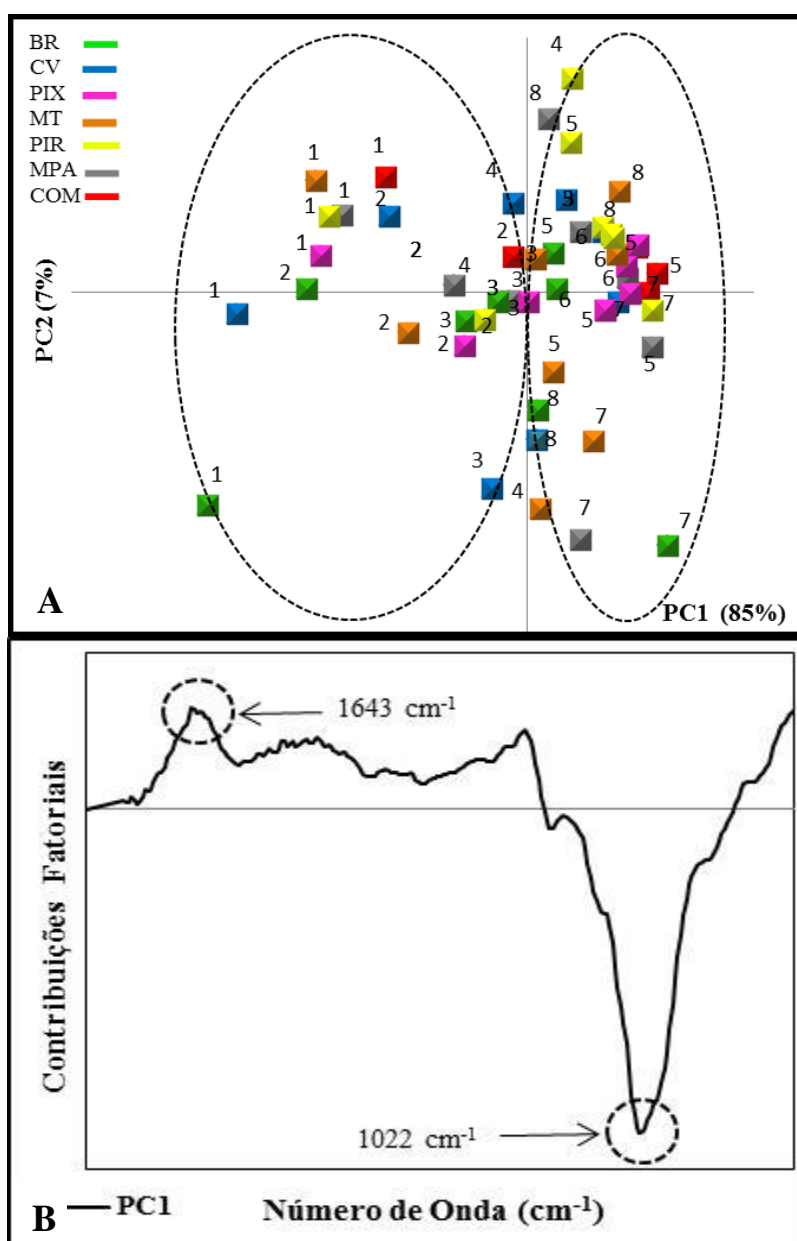
1º Espectro*					8º Espectro*			
	3300	1643	999	1643 - 999	3300	1643	999	1643 - 999
<b>BR</b>	0,68	0,06	1,00	0,94	1,00	0,10	0,90	0,80
<b>CV</b>	0,49	0,05	1,00	0,95	1,00	0,14	1,03	0,89
<b>PIX</b>	0,57	0,05	1,00	0,95	1,00	0,16	0,76	0,60
<b>MT</b>	0,55	0,06	1,00	0,94	1,00	0,19	0,80	0,61
<b>PIR</b>	0,58	0,07	1,00	0,93	1,00	0,15	0,68	0,53
<b>MPA</b>	0,57	0,06	1,00	0,94	1,00	0,16	0,96	0,80
<b>COM</b>	0,64	0,06	1,00	0,94	1,00	0,16	0,79	0,63

Os espectros foram normalizados a 1 e a linha de base corrigida (OPUS 5.0®).

\*Unidade arbitrária (u.a.).

Diante da constatação de que a humidade do ambiente estava a interferir entre as réplicas dos espectros e com o propósito de melhor visualizar esta variabilidade, aplicou-se a análise multivariada nos espectros de MID-IR através da análise em componentes principais (PCA).

O gráfico das coordenadas fatoriais (*scores*) (PC1 vs. PC2) utilizando os 8 espectros de cada amostra e toda a região espectral apresentou 92% da variabilidade total. Desta totalidade 85% é representado pelo eixo PC1. Visualiza-se claramente no gráfico das coordenadas fatoriais (Figura 2.16 A) a separação dos espectros iniciais no eixo PC1 negativo e dos últimos espectros agrupando-se no eixo do PC1 positivo.



**Figura 2.16:** (A): Gráfico das coordenadas fatoriais (*scores*) do PC1 vs PC2 referente a toda região espectral (4000 a 500 cm<sup>-1</sup>) dos amidos de milhos crioulos e comercial (8 espectros para cada amostra). (B): Representação das contribuições fatoriais (*loadings*) do eixo PC1.

As contribuições fatoriais (*loadings*) (Figura 2. 16 B) assinalam a contribuição das variáveis (número de onda) na separação observada no gráfico das coordenadas fatoriais (*scores*). O PC1 positivo (onde se encontram os últimos espectros) caracteriza a banda 1643 cm<sup>-1</sup> resultante da absorção das moléculas de água. As amostras mais secas são caracterizadas pela banda a 1022 cm<sup>-1</sup> no PC1 negativo. Esta banda pode ser relacionada



com a região amorfa do grânulo de amido (van Soest *et al.*, 1995).

Perante a modificação do espectro em função da humidade do ambiente, foi feita uma tentativa de ver se esta modificação inversa nos picos poderia estar correlacionada com o poder de inchamento dos amidos correspondentes. Os espectros sofreram correção da linha de base e foram normalizados a 1, pelo pico a  $3000\text{ cm}^{-1}$  e foi determinada a diferença entre as intensidades de absorvância entre  $999$  e  $1643\text{ cm}^{-1}$ . Não foi encontrada correlação entre este valor e o poder de inchamento às duas temperaturas ( $65$  e  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O motivo para isto pode radicar no facto de que quando há inchamento está em jogo a estrutura total do amido depois de perder a sua estrutura cristalina.

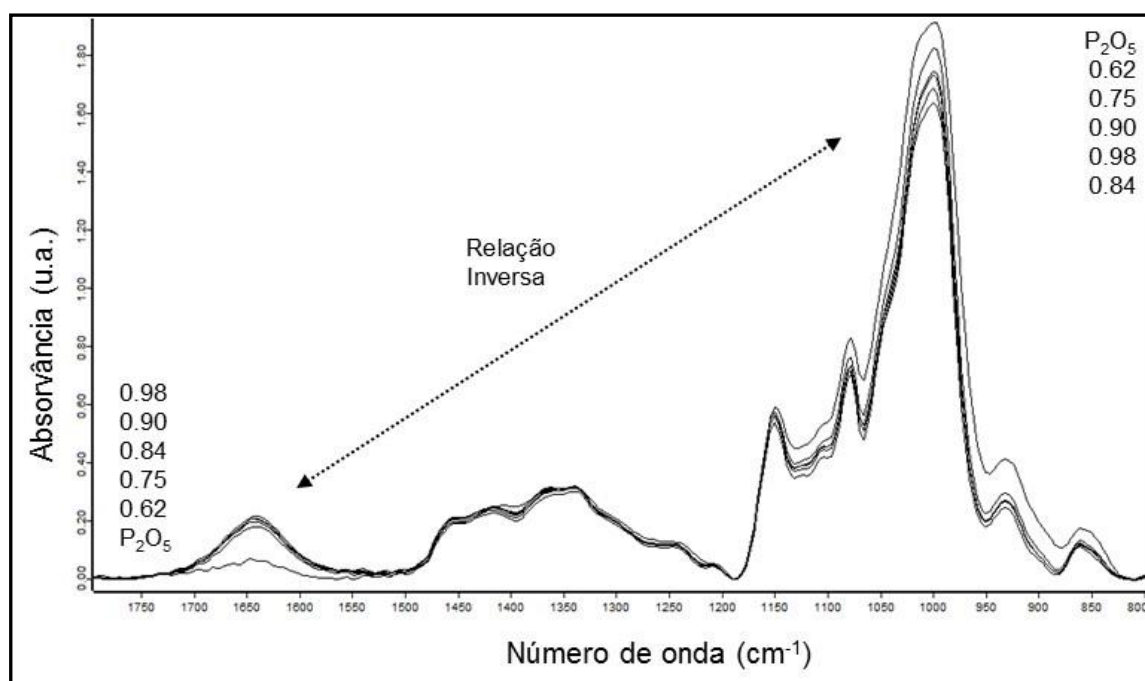
Para implementar e confirmar esta influência durante a aquisição dos espectros de MID-IR foi feito um ensaio de absorção/dessorção de água em atmosfera de humidade controlada. Para este efeito preparou-se uma série de frascos fechados de 1 L com atmosferas de humidades relativas específicas empregando-se soluções salinas saturadas. Para esta experiência utilizou-se o amido comercial (COM) o qual foi separado em pequenas porções e deixado durante 3 dias nos respetivos ambientes controlados. Os sais foram escolhidos de maneira a cobrir a atividade de água na faixa de 0.62 a 0.98 de acordo com a Tabela 2.7. Da mesma forma uma porção da amostra foi deixada em estufa de vazio com o dessecante pentóxido de fósforo (considerada amostra seca). Os espectros foram realizados imediatamente após as amostras serem retiradas destes ambientes e foram adquiridos 5 espectros por amostra.

**Tabela 2.7:** Atividade de água das soluções salinas saturadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Sal	Atividade de água
Nitrato de amónio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	0.62
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )	0.75
Cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ )	0.84
Cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ )	0.90
Dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )	0.98
Pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )*	-----

\* Estufa de vazio (3 dias)

A análise direta dos espectros permitiu a clara observação da absorção ou perda de água do amido em relação ao meio. Confirmou-se que esta propriedade afeta a intensidade das bandas a  $1643\text{ cm}^{-1}$  e na região de  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Primeiramente, pela comparação dos espectros expostos as diferentes atmosferas de humidades relativas, observou-se novamente a relação inversa entre estas duas regiões espectrais, isto é, a amostra seca com menor intensidade em  $1643\text{ cm}^{-1}$  e maior intensidade na região próxima a  $1000\text{ cm}^{-1}$  (Figura 2.17).



**Figura 2.17:** Média dos espectros do amido (COM) exposto as diferentes atmosferas de humidades relativas ( $P_2O_5$ , 0.62, 0.75, 0.84, 0.90, 0.98). Espectros normalizados e com correção de linha de base (OPUS 5.0®).

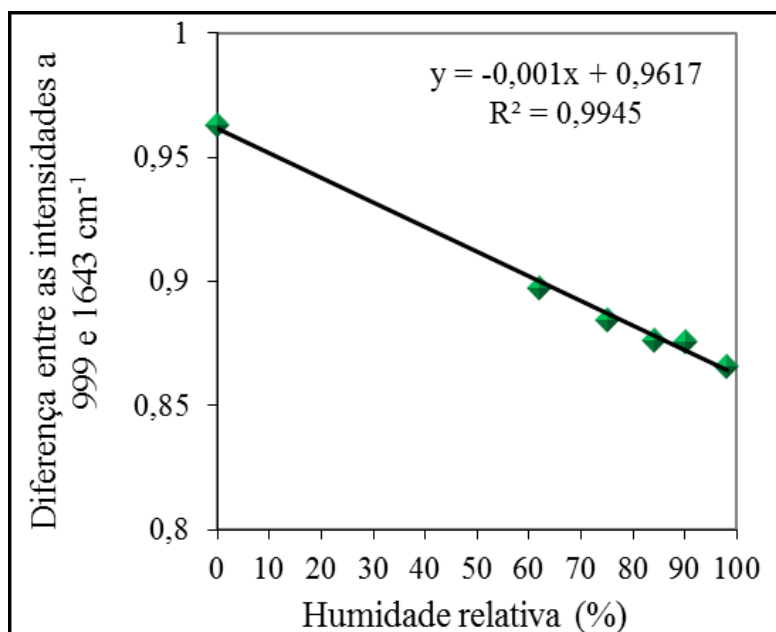
A Tabela 2.8 e a Figura 2.18 apresentam os resultados extraídos deste ensaio. Existe uma correlação entre a diferença de intensidade máxima a  $999\text{ cm}^{-1}$  e  $1643\text{ cm}^{-1}$  com as humidades do amido e observou-se que existe linearidade entre estes parâmetros, podendo-se, desta forma, obter-se uma estimativa, através do MID-IR, da humidade nos grânulos de amido. Podemos concluir que a realização imediata dos espectros por MID-IR após a retirada da humidade do amido (estufa de vazio) e de uma atmosfera com máxima humidade e a utilização da diferença de intensidades entre  $999$  e  $1643\text{ cm}^{-1}$  poderia ser utilizado como um possível método para estimar a capacidade de absorção de água pelo

grânulo. Neste trabalho não foi realizada a determinação do parâmetro de absorção de água a frio (por falta de amostra), mas é de esperar que este parâmetro se encontre correlacionado com a medição espectroscópica.

**Tabela 2.8:** Intensidades de absorvância a 999 e 1643  $\text{cm}^{-1}$ .

Humidade relativa	999 $\text{cm}^{-1}$ *	1643 $\text{cm}^{-1}$	Diferença
98	1,00	0,134	0,87
90	1,00	0,125	0,88
84	1,00	0,124	0,88
75	1,00	0,116	0,88
62	1,00	0,103	0,90
0	1,00	0,037	0,96

\* Normalizada a 1



**Figura 2.18:** Diferença entre intensidades de absorvância a 999 e 1643  $\text{cm}^{-1}$  vs humidade relativa (%).

Existem baixas correlações entre a diferença nas intensidades a 999 e 1643  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros normalizados pelo pico de 3300  $\text{cm}^{-1}$ . No caso do teor de lípidos o  $R^2$  é de 0,664, indicando que quanto mais lípidos menor a diferença entre as intensidades, ou seja menos entrada de água no grânulo. No caso do teor de amido danificado o  $R^2$  é de 0,650,

indicando que quanto mais amido danificado menor a diferença entre as intensidades. Apesar de não serem correlações muito altas, fazem sentido face aos conhecimentos sobre o efeito dos lípidos na hidratação do amido, assim como o amido danificado. Será interessante realizar estudos mais específicos sobre a aplicabilidade da espectroscopia de infravermelho na caracterização do amido.

Após esta etapa, tentou-se estabelecer uma relação entre os espectros do MID-IR com os dados químicos e com os resultados das análises térmicas (DSC) através de uma regressão multivariada (PLS1). No presente estudo, não se obteve qualquer relação através deste tratamento estatístico (dados não mostrados).

### **2.3.9 Caracterização do Comportamento Reológico – Propriedades Dinâmicas**

O comportamento reológico dos amidos extraídos das variedades de milhos crioulos e do amido comercial foi analisado através de ensaios de oscilação a baixa amplitude de deformação, os quais são amplamente utilizados para o estudo de polímeros como o amido. De acordo com o descrito anteriormente na metodologia (item 2.2.2.9), as amostras foram preparadas e analisadas a diferentes concentrações de amido (10 e 20% (m/m)), em suspensão aquosa, para assim também avaliar o efeito da concentração do amido sobre a gelificação e propriedades viscoelásticas finais das pastas ou géis obtidos, recorrendo a dois tipos de ensaios reológicos: medindo-se os módulos viscoelásticos ( $G'$  e  $G''$ ) sujeitando a amostra a varrimento em temperatura a frequência constante e, seguidamente, a varrimento em frequência de oscilação a temperatura constante.

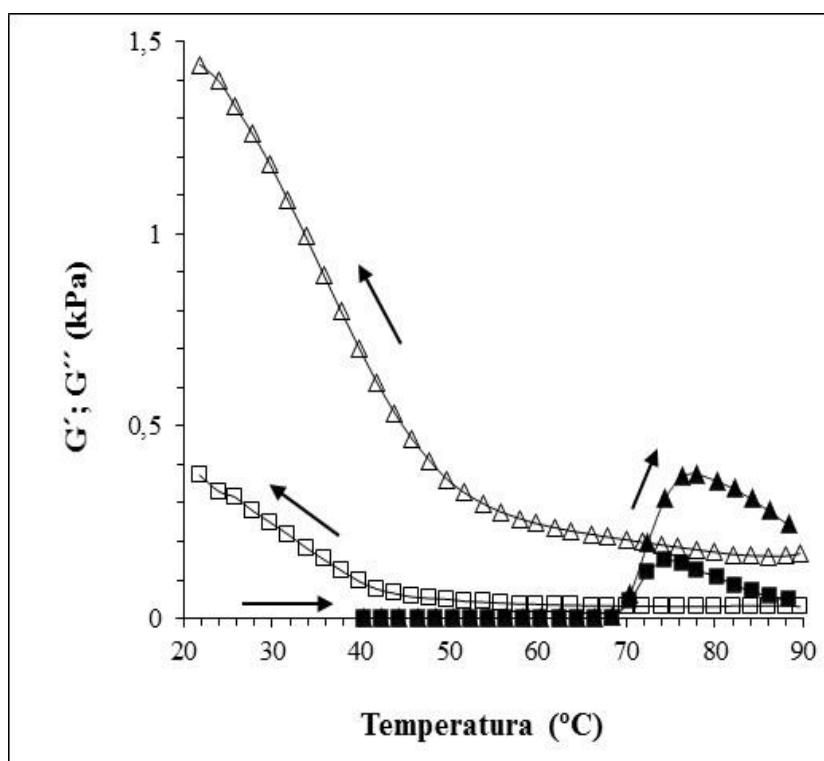
As propriedades viscoelásticas de suspensões de amido em água dependem de vários fatores como, por exemplo, a origem botânica de cada amido relacionando-se com a composição, capacidade de inchamento, danificação dos grânulos, distribuição do tamanho dos grânulos, forma, estrutura granular e cristalinidade (Singh *et al.*, 2003).

### **2.3.9.1 Varrimento em Temperatura**

Os ensaios de varrimento em temperatura foram realizados para observar e estudar as alterações no comportamento viscoelástico das suspensões de amido que ocorrem durante o aumento da temperatura e posterior arrefecimento. Avaliaram-se os eventos associados ao processo de gelatinização durante o aquecimento através da evolução dos módulos viscoelásticos de 40 a 90 °C e a estruturação das pastas ou géis formados durante o arrefecimento de 90 a 20 °C. Desta forma analisou-se o processo de gelatinização (perda da ordem molecular) das suspensões de amido e a fase inicial da retrogradação (reorganização molecular).

A primeira etapa das análises reológicas foi a determinação da zona de comportamento viscoelástico essencialmente linear das amostras (varrimento de tensão aplicada). Através destes ensaios preliminares, realizados para os sistemas a 10 e 20% (m/m) de concentração de amido, após um ciclo de aquecimento/arrefecimento (40-90-20 °C), determinou-se a amplitude de deformação que foi aplicada para preservar a estrutura das amostras durante as medições (ensaios oscilatórios não destrutivos). De acordo com os resultados obtidos, optou-se por utilizar uma amplitude de deformação de 1%.

A Figura 2.19 exemplifica a evolução dos módulos viscoelásticos ( $G'$ ;  $G''$ ), em um ciclo de aquecimento e arrefecimento, do amido MPA em água (10% m/m). Através deste varrimento em temperatura é observada a evolução similar de ambos os módulos, sempre com  $G'$  apresentando valores superiores ao  $G''$  e, sendo estes módulos relacionados com o aumento da elasticidade e viscosidade do sistema, respetivamente.



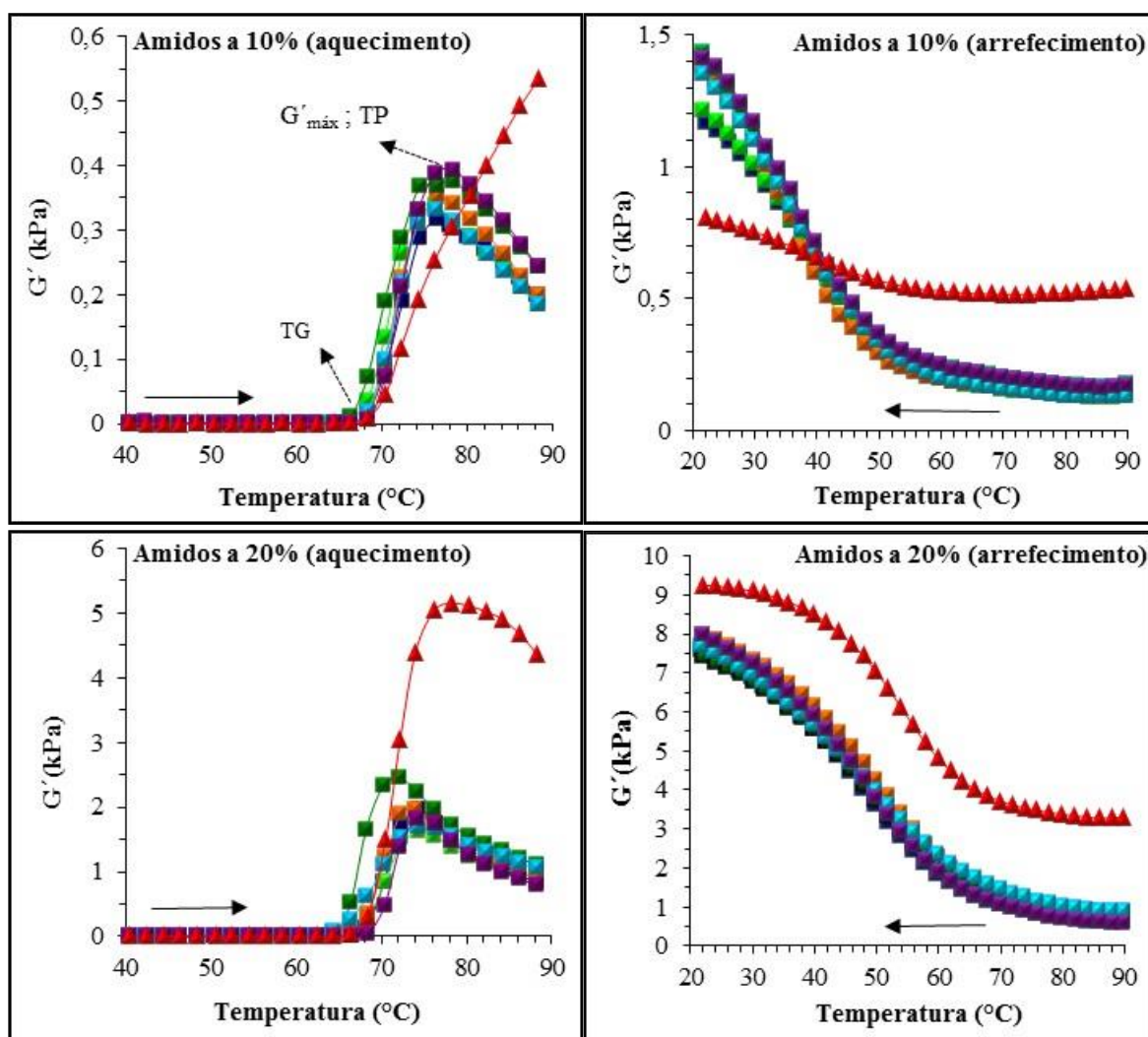
**Figura 2.19:** Exemplo do perfil geral da evolução dos módulos viscoelásticos ( $G'$ ;  $G''$ ) em função da temperatura durante o ciclo de aquecimento (40 – 90 °C) e arrefecimento (90 – 20 °C). Amido MPA a 10% de concentração em suspensão aquosa (m/m). Frequência de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1 °C /min.

▲  $G'$  40 - 90 °C    △  $G'$  90 - 20 °C    ■  $G''$  40 - 90 °C    □  $G''$  90 - 20 °C.

Num primeiro momento, na fase inicial de aquecimento (entre 40 e  $\pm$  65 °C, dependendo da concentração) não ocorrem mudanças significativas no perfil reológico do amido (nesta fase a integridade dos grânulos é conservada pelas ligações de hidrogénio intermoleculares e o aumento do volume é reversível). Na sequência ocorre uma evidente elevação dos módulos viscoelásticos a partir de um valor crítico, que pode ser identificado como temperatura de gelatinização. Neste ponto, é iniciado o aumento irreversível do volume dos grânulos, com a perda das ligações de hidrogénio que mantinham a estrutura dos mesmos, e são estabelecidas ligações entre os grupos hidroxilo dos polímeros de amilose e amilopectina com a água e desta forma o volume dos grânulos aumenta com a gradual elevação da temperatura. Como ocorre o aumento de volume dos grânulos o espaço entre eles torna-se menor e as interações são potencializadas, o que resulta na difusão dos componentes intragranulares para o meio aquoso (principalmente da amilose) e

na formação de uma estrutura em rede. Na sequência os módulos viscoelásticos atingem um ponto máximo que corresponde à capacidade máxima de intumescimento e ocorre o início da rutura granular observando-se o decréscimo dos módulos. Com a continuação da elevação da temperatura os módulos vão decrescendo e a desintegração da estrutura granular do amido continua. Nesta fase, tem-se uma mistura dos componentes intragranulares lixiviados e ainda permanecem alguns grânulos que não foram desintegrados e a estrutura que havia sido formada é destruída pelo aquecimento (ocorrendo a fusão das regiões cristalinas restantes nos grânulos inchados). Durante o arrefecimento a evolução dos módulos é devido à reorganização molecular (principalmente uma rápida reassociação da amilose através de ligações de hidrogénio, formando uma pasta ou gel dependendo da concentração de amido e da lixiviação dos componentes intragranulares). Este comportamento está de acordo com o evidenciado em outros trabalhos de caracterização de amidos (Li e Yeh, 2001; Kaur *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Sodhi e Singh, 2003; Sandhu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). O gel de amido, obtido após o ciclo de aquecimento e arrefecimento, pode ser considerado como uma estrutura que apresenta grânulos hidratados e cadeias de amilopectina incorporados em uma matriz contínua de moléculas agregadas de amilose (Ahmad e Willians, 1998).

Na Figura 2.20, está apresentada a evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da temperatura para os amidos nas concentrações de 10 e 20% (m/m). É notória a já esperada influência da concentração do amido no comportamento reológico dos sistemas e, como é possível observar, quanto maior a disponibilidade de água menor o valor do módulo. Este comportamento pode ser atribuído ao menor número de grânulos, a interações mais fracas ocorridas entre os grânulos de amido e a menor quantidade de material intragranular lixiviado, quando a concentração do polímero é menor, o que resulta em menores módulos. O sistema a 10% de concentração de amido resultou em menores módulos ocorrendo um significativo aumento a 20% de concentração (m/m). O aumento nos módulos com o aumento da concentração de amido está de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (Hansen *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2008).



**Figura 2.20:** Evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da temperatura para os amidos nas concentrações de 10 e 20% (m/m) em água. Frequência de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1 °C /min.

TG: temperatura inicial do processo de gelatinização, TP: temperatura de pico,  $G'_{\text{máx}}$ :  $G'$  máximo.

■ BR, ■ CV, ■ PIX, ■ MT, ■ PIR, ■ MPA, ▲ COM.

Foram observadas diferenças na evolução do comportamento viscoelástico entre os amidos provenientes das variedades crioulas e o amido comercial, quer no aquecimento quer no arrefecimento. Com relação ao ciclo de aquecimento, o observado a 10% de concentração dos amidos crioulos foi que estes sistemas apresentaram o aumento de  $G'$ , alcançaram o  $G'_{\text{máx}}$  e, seguidamente apresentaram a queda do módulo com a elevação da temperatura. Ao contrário, nesta concentração, o amido comercial não apresentou a queda do módulo no ciclo de aquecimento e teve um valor mais elevado de  $G'_{\text{máx}}$ . Através desta resposta pode-se interpretar que aos 90 °C, diferentemente dos amidos crioulos, no amido



COM não foi ainda atingida a rutura significativa dos grânulos para esta temperatura e tempo de aquecimento, correspondendo a uma gelatinização incompleta dos grânulos de amido, não se alcançando a queda do módulo.

Para a concentração de 20% os amidos crioulos também apresentaram perfis reológicos muito semelhantes, verificando-se a tendência a um plateau com o aumento da temperatura, devido à maior destruição granular. Durante o ciclo de aquecimento, entre os amidos crioulos, o amido da variedade MT apresentou maior  $G'_{\text{máx}}$  (inchamento e início da rutura granular) e menor temperatura de pico. Diferenças neste amido também foram observadas nas análises de DSC e do poder de inchamento, facto que vem a complementar o observado nas análises reológicas (discutido posteriormente). O perfil do amido comercial (COM), a 20% de concentração, já apresentou queda de  $G'_{\text{máx}}$  próximo aos 80 °C, para além de valor de  $G'_{\text{máx}}$  significativamente maior e de uma curva mais ampla antes da queda do módulo, quando comparado aos amidos crioulos. Isto indica que a rutura e desintegração granular (devido ao aquecimento) foram processos mais lentos para o amido comercial. Este conjunto de observações demonstra que a concentração de amido no sistema, que envolve menor ou maior interação entre os grânulos, altera significativamente o perfil reológico do amido. As diferenças no valor máximo alcançado pelos módulos ( $G'_{\text{máx}}$ ), no ciclo de aquecimento, são discutidas em parágrafos posteriores.

Ainda na Figura 2.20, durante o arrefecimento dos sistemas de amidos já gelatinizados, o aumento de  $G'$  que se observa com a diminuição da temperatura é a estruturação que ocorre pela retrogradação imediata (correspondendo a uma reorganização estrutural). Como já descrito anteriormente neste trabalho, as cinéticas de retrogradação da amilose e da amilopectina são diferentes, sendo rápida para a amilose e podendo envolver dias e semanas para a amilopectina. Em geral, a evolução da estrutura dos sistemas foi muito semelhante entre os amidos das variedades crioulas diferindo do amido comercial (e diferindo com a concentração de amido, assim como ocorre no ciclo de aquecimento). De acordo com o estudo realizado por Hansen e colaboradores (1991), em sistemas de amido e água com diferentes concentrações, este aumento acentuado durante o arrefecimento demarca a temperatura em que ocorre a transformação sol-gel, devido à formação de ligações entre as cadeias de amilose (estruturação do sistema). A 10% de concentração, ao

serem arrefecidos de 90 °C até aproximadamente 50 °C, os sistemas dos amidos crioulos gelatinizados praticamente não sofreram alteração, observando-se um aumento acentuado de  $G'$  abaixo desta temperatura. Assim, pode-se dizer que na temperatura de  $\approx 50$  °C inicia-se a estruturação dos sistemas dos amidos crioulos através do estabelecimento de ligações entre as cadeias de amilose. Já o amido comercial (COM), o qual durante o aquecimento demonstrou aos 90 °C não ter uma rutura significativa dos grânulos (gelatinização incompleta), apresentou uma estruturação mais linear, ou seja, menos intensa e bem sutil a partir dos 50 °C. De acordo com as curvas obtidas no ciclo de aquecimento dos amidos crioulos (10%), uma maior quantidade de amilose e também de amilopectina foram lixiviadas para o meio em comparação com a curva do amido comercial (COM). A amilose presente no meio aquoso contribui para a estruturação do sistema, no entanto, a amilopectina é correlacionada ao enfraquecimento da estrutura em formação, por dificultar a associação das cadeias de amilose durante o arrefecimento (Hansen *et al.*, 1991). Desta maneira, poderia-se entender que a maior quantidade de amilopectina no meio aquoso dos sistemas dos amidos crioulos, resultasse em menor estruturação quando comparada à estruturação do sistema do amido comercial, o que não ocorreu. Esta resposta indica que outro fator, como os grânulos remanescentes presentes em maior extensão no sistema do amido comercial, exerceu uma influência de maneira negativa no desenvolvimento da estrutura e, dificultou a reorganização das cadeias de amilose neste sistema durante o ciclo de arrefecimento.

Na concentração de amido a 20%, durante o arrefecimento, os sistemas apresentaram maior similaridade entre os amidos em estudo, com a estruturação iniciando aproximadamente aos 65 °C. Nesta concentração o amido comercial obteve melhor estruturação do que a 10%, o que condiz com a observação da parcial rutura granular que foi alcançada no aquecimento, resultando em valor final de  $G'$  superior aos amidos crioulos. Assim, as curvas resultantes do ciclo de aquecimento e arrefecimento, dos sistemas de amido em estudo, denotam que o processo de gelatinização dos amidos ocorreu em diferentes extensões, de acordo com a hidratação dos sistemas, existindo uma relação com a estrutura granular, discutidas posteriormente.

A Tabela 2.9 apresenta os valores da temperatura de início do processo de

gelatinização, temperatura de pico e  $G'_{\text{máx}}$ , obtidos durante o ciclo de aquecimento, os quais serão correlacionados quer com a concentração quer com outros fatores. Como demonstrado na descrição dos perfis, a concentração de amido tem grande influência nas propriedades viscoelásticas do amido. Mas para além da concentração, a composição, a capacidade de inchamento, o teor de danificação, o tamanho, a forma e estrutura granular, entre outros, são descritos como fatores importantes nos parâmetros reológicos, sendo, portanto, individualmente analisados.

**Tabela 2.9:** Parâmetros obtidos com base na variação do módulo elástico, durante o aquecimento, das suspensões aquosas dos amidos de milho crioulo e do amido comercial a 10% e 20% (m/m).

	BR	CV	PIX	MT	PIR	MPA	COM
<b>10%</b>							
TG (°C)	<b>64.8<sup>ab</sup></b>	<b>63.4<sup>a</sup></b>	<b>64.4<sup>ab</sup></b>	<b>64.0<sup>ab</sup></b>	<b>64.1<sup>ab</sup></b>	<b>65.8<sup>b</sup></b>	<b>64.6<sup>ab</sup></b>
	± 0.1	± 1.3	± 0.0	± 0.2	± 2.6	± 0.8	± 0.8
TP (°C)	<b>76.2<sup>a</sup></b>	<b>76.2<sup>a</sup></b>	<b>76.4<sup>a</sup></b>	<b>76.2<sup>ab</sup></b>	<b>76.3<sup>a</sup></b>	<b>78.2<sup>b</sup></b>	<b>&gt; 90<sup>c</sup></b>
	± 2.6	± 0.2	± 0.0	± 1.6	± 0.0	± 0.2	
$G'_{\text{máx}}$ (kPa)	<b>0.3<sup>a</sup></b>	<b>0.3<sup>a</sup></b>	<b>0.3<sup>a</sup></b>	<b>0.4<sup>a</sup></b>	<b>0.3<sup>a</sup></b>	<b>0.4<sup>a</sup></b>	<b>0.5<sup>b</sup></b>
	± 0.1	± 0.1	± 0.0	± 0.0	± 0.1	± 0.0	± 0.2
<b>20%</b>							
TG (°C)	<b>64.5<sup>de</sup></b>	<b>62.2<sup>abc</sup></b>	<b>63.0<sup>bc</sup></b>	<b>61.2<sup>ab</sup></b>	<b>61.0<sup>a</sup></b>	<b>65.2<sup>e</sup></b>	<b>63.5<sup>cd</sup></b>
	± 0.4	± 0.0	± 1.4	± 0.9	± 0.9	± 1.3	± 1.0
TP (°C)	<b>74.2<sup>b</sup></b>	<b>74.3<sup>bc</sup></b>	<b>74.1<sup>b</sup></b>	<b>72.0<sup>a</sup></b>	<b>75.3<sup>d</sup></b>	<b>75.2<sup>cd</sup></b>	<b>78.1<sup>e</sup></b>
	± 0.1	± 0.1	± 0.1	± 0.1	± 1.4	± 1.3	± 0.1
$G'_{\text{máx}}$ (kPa)	<b>2.0<sup>ab</sup></b>	<b>1.6<sup>a</sup></b>	<b>2.0<sup>ab</sup></b>	<b>2.5<sup>b</sup></b>	<b>1.7<sup>a</sup></b>	<b>1.8<sup>a</sup></b>	<b>5.2<sup>c</sup></b>
	± 0.6	± 0.4	± 0.5	± 0.3	± 0.6	± 0.2	± 0.1

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ).

TG: temperatura inicial do processo de gelatinização, TP: temperatura de pico,  $G'_{\text{máx}}$ :  $G'$  máximo.

Quanto à temperatura de início do processo de gelatinização dos sistemas de amidos, considerada como a temperatura na qual os módulos viscoelásticos aumentam intensamente, observa-se a já esperada influência da concentração. Para os sistemas a 10% de amido a variação foi entre 63.4 e 65.8 °C havendo uma diminuição a 20% ocorrendo

entre 61.0 e 65.2 °C. Isto demonstra que quanto mais concentrado o sistema maior a interação entre os grânulos, devido ao menor espaço entre eles, observando-se assim o aumento dos módulos a temperaturas inferiores. Esta relação concentração/temperatura de gelatinização está de acordo com o evidenciado no processo de gelatinização realizado por outros autores em análises reológicas (Singh *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2002).

A temperatura de pico, que corresponde ao ponto no qual o  $G'$  apresenta o máximo valor, variou entre 76.2 e > 90 °C (10%) e 72.0 e 78.1 °C (20%). Estas temperaturas foram inferiores para todos os amidos crioulos quando comparadas à temperatura de pico do amido comercial. Este dado indica que a parcial rutura granular necessitou de menor temperatura para iniciar nos amidos crioulos. Este é um fator de diferenciação que demonstra que os amidos crioulos iniciam a parcial rutura e dissolução dos grânulos em temperaturas inferiores quando comparados ao amido comercial.

Como já visualizado diretamente no perfil das curvas obtidas, o  $G'_{\text{máx}}$  foi o parâmetro com a maior variação principalmente entre os amidos crioulos e o comercial, sendo esta gama, respetivamente, entre: 0.3 - 0.4 kPa e 0.5 kPa (10%); 1.6 - 2.5 kPa e 5.2 kPa (20%). O valor alcançado pelo  $G'_{\text{máx}}$  pode ser influenciado por diversos fatores como é descrito em diferentes trabalhos de caracterização reológica de amidos. Li e Yeh (2001) analisaram amidos de diferentes fontes a 20% de concentração e relacionaram o  $G'_{\text{máx}}$  com uma relação inversa ao poder de inchamento (amidos de cereais e de ervilha que apresentaram o menor poder de inchamento tiveram maiores valores de  $G'_{\text{máx}}$ ) e ao tamanho dos grânulos (menores grânulos com maiores  $G'_{\text{máx}}$ ). Kaur *et al.* (2002) analisaram o comportamento reológico dos amidos de três cultivares de batata (15%) e associaram o aumento nos valores de  $G'_{\text{máx}}$  com o maior tamanho granular, maior teor de amilose e maior poder de inchamento. Singh *et al.* (2003) relatam o aumento de  $G'_{\text{máx}}$  com diferenças na estrutura granular, aos grânulos maiores e irregulares, maior teor de amilose e menor teor de lípidos e uma diminuição de  $G'_{\text{máx}}$  para amidos que apresentam complexos amilose/lípidos, maior teor de proteínas ou danificação granular. Sodhi e Singh (2003) analisaram cinco cultivares de arroz (20%) e encontraram relação entre os maiores valores de  $G'_{\text{máx}}$  e o maior teor de amilose mas, ao contrário de outros autores, com o menor poder de inchamento dos grânulos. Sandhu *et al.* (2004) analisaram o amido de diferentes tipos

de milho (20%) e concluíram que as propriedades reológicas dos amidos dependem principalmente da interação e da rigidez granular durante o processo de aquecimento e associaram os maiores valores de  $G'_{\text{máx}}$  com o maior tamanho dos grânulos. Lu *et al.* (2009) analisaram o comportamento reológico de amidos de arroz (38%) relativamente ao teor de amilose (1.2, 6.8, 14.2, 17.0 e 19.8%) e ao tipo de arroz (mesmo teor de amilose), obtendo também uma boa correlação entre o teor de amilose e o  $G'_{\text{máx}}$ . Nos amidos com o mesmo teor de amilose os autores encontraram uma relação entre o maior  $G'_{\text{máx}}$  e a menor quantidade de amilopectina de cadeias longas.

De acordo com os trabalhos citados, pode-se verificar que a composição dos amidos demonstra correlação com diferenças obtidas no  $G'_{\text{máx}}$ . No presente trabalho não se identificou alguma correlação significativa entre os valores de  $G'_{\text{máx}}$  e os teores de amilose ou de proteínas; as variações verificadas no  $G'_{\text{máx}}$  estarão dependentes doutros fatores, já que as quantidades destes constituintes não são significativamente diferentes entre os amidos. Já os lípidos, os quais estão presentes em maior proporção no amido comercial (0.98%), bem como a presença de complexos lípidos/amilose (observada neste mesmo amido através da difração de raios-X), podem ter contribuído para influenciar este parâmetro. A influência dos lípidos no desenvolvimento de  $G'$  foi já discutida noutros trabalhos. Por exemplo, Ahmed *et al.* (2008) compararam o perfil reológico de uma suspensão de amido com uma suspensão de farinha, verificando que, o  $G'$  da suspensão de farinha apresentou uma elevação superior ao  $G'$  da suspensão de amido. Para além, o  $G'_{\text{máx}}$  da suspensão de farinha foi constante durante maior faixa de temperatura antes de sua queda, quando comparado à suspensão de amido, e este fator foi atribuído à resistência da lixiviação da amilose pela presença de maior quantidade de lípidos e também de proteínas. Assim, com a informação obtida no presente trabalho e em termos de composição dos amidos, considera-se que os lípidos serão a fração responsável pelas diferenças observadas entre o perfil reológico do amido COM e dos amidos crioulos.

Com relação ao tamanho dos grânulos, na maioria das associações com o  $G'_{\text{máx}}$ , são observados maiores valores para amidos que contém grânulos maiores (Kaur *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Sandhu *et al.*, 2004). No entanto, a danificação granular diminui o  $G'_{\text{máx}}$  (Singh *et al.*, 2003) e pode ter interferido no desenvolvimento de  $G'$ . Para melhor

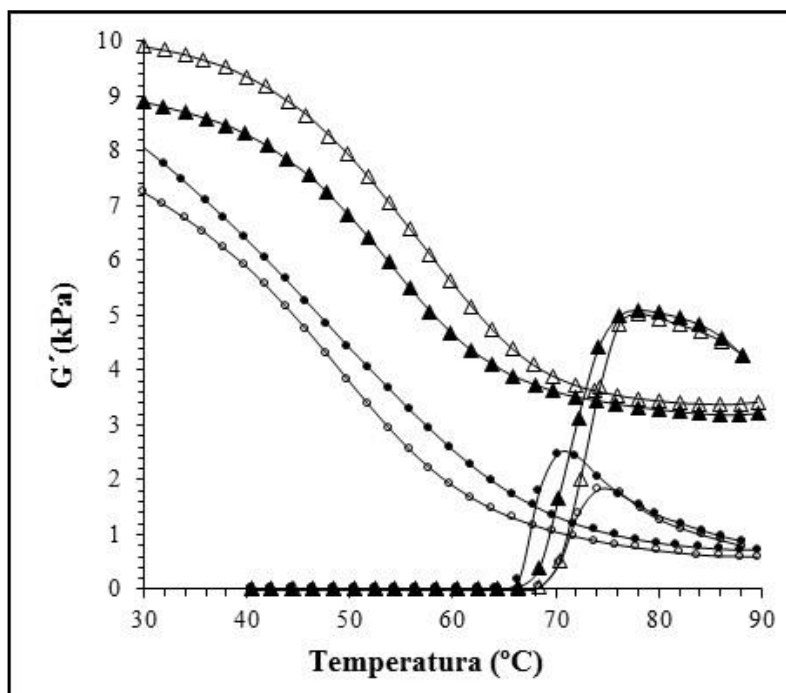
tentar correlacionar o tamanho granular com o  $G'_{\text{máx}}$ , sem interferência da danificação, foram comparados os amidos com teores similares de grânulos danificados, ou seja, os amidos BR e MPA (1.3 e 1.4% de danificação, respetivamente). O BR tem uma menor percentagem de seus grânulos em tamanhos superiores a 11  $\mu\text{m}$  ao contrário do MPA (44.3 e 55.3%, respetivamente), portanto, grânulos menores para o BR e maiores para o MPA. Nos sistemas a 10% de amido consegue-se associar os maiores valores de  $G'_{\text{máx}}$  com os grânulos maiores do MPA, no entanto, esta correlação não é encontrada para os sistemas a 20% de concentração. O amido comercial, entre todos os amidos em estudo, apresentou a maior proporção de grânulos grandes (77% com tamanho acima de 11  $\mu\text{m}$ ) e está entre os maiores valores de  $G'_{\text{máx}}$ . Assim, no presente trabalho esta relação é bastante subjetiva e não linear para todos os amidos nos diferentes sistemas analisados.

O inchamento granular irreversível, observado na reologia durante a elevação de  $G'$ , relacionado com a rutura das ligações de hidrogénio existentes entre os componentes do amido, demonstrou diferenças principalmente entre os amidos crioulos e o comercial. Diferenças observadas no perfil reológico, quer entre amidos de fontes distintas quer entre amidos de diferentes variedades, também são atribuídas ou interpretadas com base em diferenças estruturais (Li e Yeh, 2001; Kaur *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Sodhi e Singh, 2003; Sandhu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2009). Considerando as diferenças na elevação de  $G'$ , na parcial rutura granular e na dissolução da estrutura formada durante o aquecimento, que ocorreram em diferentes extensões, existe uma indicação de que as ligações de hidrogénio entre os componentes do amido diferem entre os amidos crioulos e o comercial, sendo também influenciada pela concentração do sistema. Nos sistemas mais diluídos, nos quais a interação dos grânulos é menor, os amidos crioulos apresentam claramente menores valores de  $G'_{\text{máx}}$  do que o amido comercial. Este resultado demonstra que as ligações de hidrogénio, que mantém a estrutura granular, são rompidas com maior facilidade nos amidos crioulos (menor temperatura de pico). Isto também corrobora com a extensão da queda dos módulos associada ao grau de desintegração dos grânulos de amido (amido comercial maior integridade granular e menor queda dos módulos). Com a maior difusão dos componentes intragranulares nos amidos crioulos, ocorre maior ligação à água disponível no sistema. Esta observação complementa o resultado obtido na análise do poder de inchamento (Figura 2.9), maior a 90 °C para os amidos crioulos. Assim, observa-

se que as propriedades reológicas e o perfil obtido para os amidos demonstram apresentar relação com diferenças na rigidez granular, ou seja, nas ligações que a mantem o grânulo. Para além, pode-se observar que a interação granular também afetou o desenvolvimento de  $G'$  e consequentemente o  $G'_{\text{máx}}$ , visto que no caso dos sistemas concentrados as diferenças observadas entre os amidos crioulos e o comercial são menores.

Assim, observou-se que nos amidos em estudo, a finalização do processo de gelatinização e consequentemente os perfis reológicos apresentaram relação com a estrutura e com a concentração de amido nos sistemas, diferindo de acordo com a ruptura das ligações entre os componentes do amido e com a interação granular, sendo que os diversos fatores discutidos estão interligados aos resultados obtidos.

Na sequência do trabalho, também foi questionado se o perfil reológico obtido para os amidos crioulos foi influenciado ou não pelo método de isolamento utilizado. Para confirmar se a diferença observada nos ciclos de aquecimento e arrefecimento, entre os amidos crioulos e o comercial, é mesmo inerente aos amidos ou se, de alguma forma, teria ocorrido alguma influência da metodologia de isolamento, procedeu-se uma nova comparação. Para esta análise, foi realizado um varrimento em temperatura (aquecimento e arrefecimento) no amido da variedade MPA isolado com a utilização de duas metodologias diferentes (método descrito na Figura 2.2 e tratamento alcalino com NaOH e NaHSO<sub>3</sub> descrito em Sandhu *et al.*, 2004). Para comparação do perfil reológico, além do amido comercial da marca Maizena® (COM), também foi utilizado outro amido de milho comercial da marca Espiga®. A Figura 2.21 apresenta estes varrimentos em temperatura. Verificou-se que os amidos comerciais apresentam perfil reológico semelhante, assim como os da variedade crioula MPA isolados através de diferentes metodologias.



**Figura 2.21:** Comparação do perfil reológico durante os ciclos de aquecimento e arrefecimento dos amidos (comerciais e do amido crioulo MPA isolado a partir de diferentes metodologias). Suspensões de amido em água (20% m/m).

- △ Amido comercial (COM);
- ▲ Amido comercial (Espiga);
- Amido MPA (isolado conforme descrito na Figura 2.2);
- Amido MPA (isolado conforme descrito em Sandhu *et al.*, 2004).

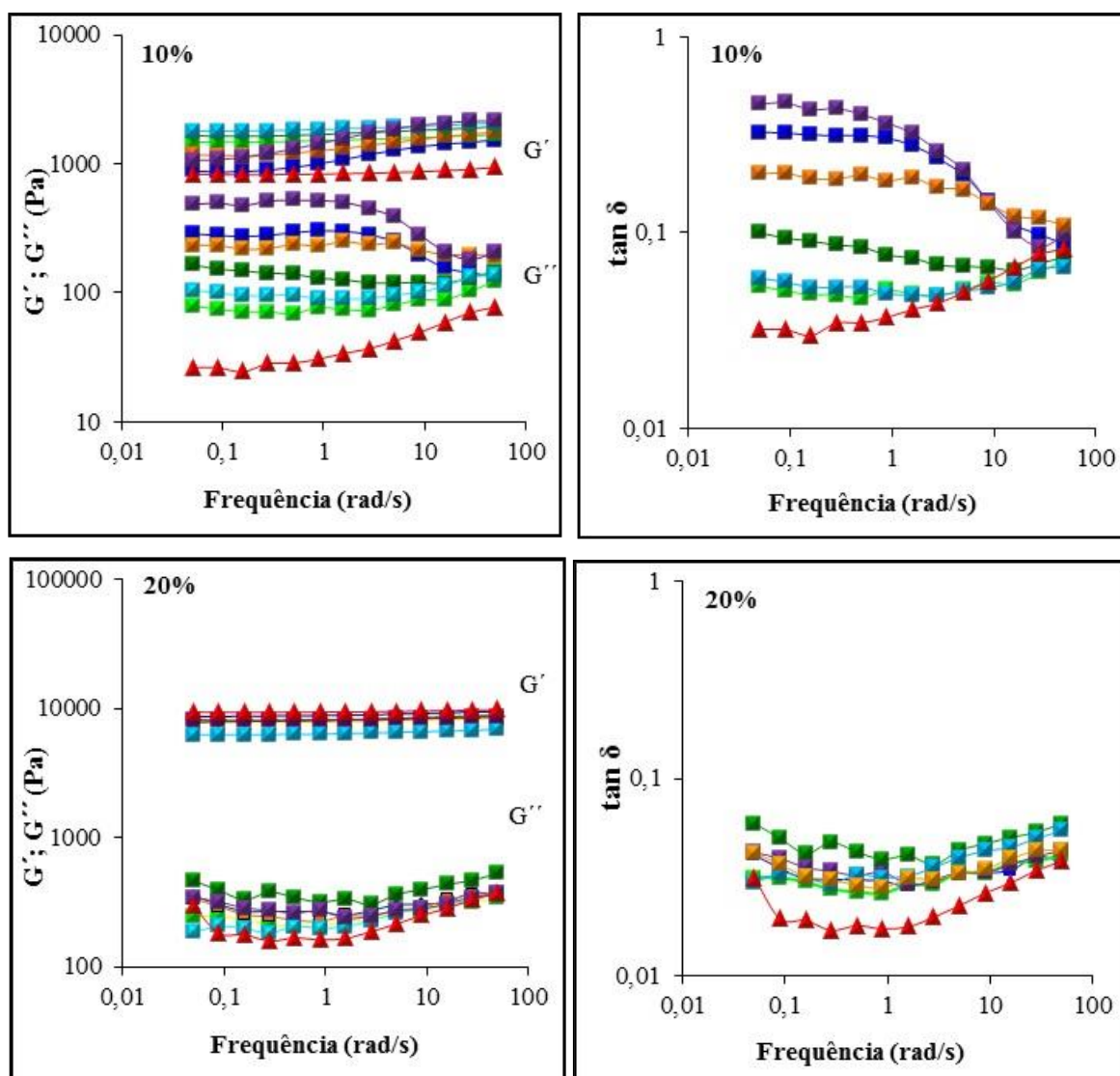
Desta maneira foi possível concluir que o comportamento reológico diferenciado entre o amido comercial e os crioulos não foi influenciado pelo método de isolamento. As diferenças observadas entre amidos do mesmo tipo serão com certeza devidas a pequenas diferenças de composição ou estrutura granular.

### 2.3.9.2 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos

Os ensaios de varrimento em frequência de oscilação (espectro mecânico) permitem avaliar a influência que a frequência de oscilação aplicada exerce sobre os módulos viscoelásticos ( $G'$  e  $G''$ ). Desta forma, os ensaios foram realizados para observar o comportamento viscoelástico dos amidos gelatinizados (sob amplitude de deformação constante variando apenas a gama de frequência aplicada).



Para esta finalidade, imediatamente após o término do varrimento em temperatura, as amostras foram submetidas ao varrimento em frequência de oscilação sob temperatura constante de 20 °C. A Figura 2.22 apresenta os espectros mecânicos e a representação da  $\tan \delta$ , respectivamente, obtidos após o processo de gelatinização dos amidos crioulos e comercial nas concentrações de 10 e 20% (m/m).



**Figura 2.22:** Espectros mecânicos dos amidos nas concentrações de 10 e 20% (m/m), após o tratamento térmico, e respectivas  $\tan \delta$ .

■ BR, ■ CV, ■ PIX, ■ MT, ■ PIR, ■ MPA, ▲ COM.

Verifica-se que, independente da concentração, o módulo elástico ( $G'$ ) é superior ao módulo viscoso ( $G''$ ) para todos os amidos gelatinizados e na mesma gama de frequência analisada, o que indica a formação de um gel com predominância de características elásticas, ou seja, o comportamento viscoelástico de sólido ( $G' > G''$ ). A formação de gel em sistemas de amido geralmente ocorre acima de 6% de concentração, fator que varia de acordo com o teor de amilose (Ahmad e Willians, 1998), em concordância com o observado nos sistemas dos amidos em estudo (formação de gel nas duas concentrações estudadas).

Em geral os amidos crioulos apresentaram um comportamento viscoelástico semelhante, exceto para a menor concentração de amido e assim maior disponibilidade de água, onde foram evidentes diferenças no caráter elástico dos géis finais. De realçar também que o amido comercial apresentou, nas duas condições, um caráter elástico mais pronunciado, mesmo quando os valores de  $G'$  foram inferiores àqueles medidos para os géis dos amidos crioulos.

Quanto à concentração, como já era esperado, observa-se o aumento dos módulos de acordo com o aumento da concentração de amido. Este aumento do módulo elástico com o aumento da concentração de amido está de acordo com outros trabalhos da literatura (Ahmad e Williams, 1998; Rosalina e Bhattacharya, 2002; Santos *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2012).

A dependência de  $G'$  e  $G''$  relativamente à frequência aplicada fornece informações sobre a estrutura da amostra e, de acordo com o espectro mecânico, pode-se classificar os géis formados como fracos ou fortes, da seguinte maneira: geralmente o comportamento de um gel forte (elevada perfeição da rede macromolecular tridimensional) é traduzido por  $G'$  uma ou duas décadas superiores a  $G''$  e ambos os módulos são independentes da frequência na gama experimental analisada. Nos géis fracos (maior grau de imperfeição) o caráter elástico é menor e os módulos apresentam maior dependência perante a frequência de oscilação, o que significa que é possível a ocorrência de rearranjos moleculares (Lapasin e Pricl, 1995; Lopes da Silva *et al.*, 2004). Assim, a independência da frequência ao longo de uma ampla faixa reflete um comportamento ideal de sólido. Em

contrapartida, uma forte dependência da frequência sugere que o material apresenta estrutura com emaranhamentos moleculares comportando-se mais como um sólido a altas frequências e mais como um líquido a baixas frequências (Ross-Murphy, 1984).

Observando-se a Figura 2.22 para 10% de concentração, verificou-se entre os géis dos amidos diferença nos valores de  $G''$ , a qual diminuiu a partir de 10 rad/s. Entre os géis dos amidos crioulos, sob baixas frequências de oscilação, a diferença entre os módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) foi menor para os amidos das variedades MPA, BR e PIX. Como este varrimento foi realizado imediatamente após o processo de gelatinização, esta variação pode ser proveniente do facto dos géis de amido serem géis fracos e estarem sofrendo rearranjos na rede tridimensional. As diferenças entre os módulos, traduzidas no valor da  $\tan \delta$ , atenuam-se para frequências mais elevadas, onde o tempo de solicitação não permite a ocorrência de re-arranjos moleculares ou supra-moleculares responsáveis pelas maiores diferenças de comportamento a menores frequências.

Outros autores também relataram resultados semelhantes, com dependência da frequência e géis fracos, ao analisarem o comportamento viscoelástico de amidos em concentração até 10% (Ahmed e Willians, 1998; Rosalina e Bhattacharya, 2002; Kim e Yoo, 2009; Osundahunsi *et al.*, 2011; Bahrani, *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2012; Bahrani, *et al.*, 2013). Os géis formados com 20% de amido apresentaram maior linearidade nos módulos. O  $G'$ , para todos os géis, praticamente não foi influenciado pela variação da frequência de oscilação e o  $G''$  apresentou um ligeiro aumento a partir de 1 rad/s. Em toda a gama de frequência os valores de  $G'$  foram altos e consideravelmente maiores do que  $G''$  classificando-os como géis mais estruturados e fortes.

## **2.4 CONCLUSÕES**

Neste capítulo, o estudo dos amidos extraídos das variedades de milho crioulo, provenientes do município de Anchieta (Brasil), permitiu a avaliação da composição química destes biopolímeros, a qual é deveras similar, classificando-os, referente aos teores de seus componentes maioritários (amilose/amilopectina), como amidos de milho normal.

Através da análise microscópica observou-se, para além de grânulos bem isolados, que o tamanho dos mesmos nas variedades crioulas apresenta heterogeneidade (amidos das variedades CV, PIX e MPA com grânulos maiores) com formato desde o arredondado até o poliédrico (grânulos menores e maiores, respetivamente).

A difração de raios-X demonstrou que todos os amidos apresentam padrão de cristalinidade do tipo A e não indicou a presença de amilose complexada com lípidos nos amidos crioulos. O amido da variedade MT foi o que apresentou a menor percentagem de cristalinidade.

O poder de inchamento foi maior para o amido da variedade MT e menor para o amido da variedade PIR, nas duas temperaturas analisadas. Comparativamente com o amido comercial os amidos das variedades crioulas demonstraram maior facilidade na rutura das ligações de hidrogénio e na formação de novas ligações com a água.

As análises térmicas, realizadas através do DSC, demonstraram propriedades funcionais diferenciadas entre alguns dos amidos. O processo de gelatinização destacou o amido da variedade MT com os menores valores de  $T_0$  (início do processo de gelatinização) e  $T_p$  (comprimento das duplas hélices de amilopectina) e o amido da variedade MPA com os maiores valores. A faixa de temperatura de gelatinização ( $R_{gel}$ ) foi menor para o amido da variedade BR e maior para o amido da variedade MT, demonstrando a ocorrência do processo de gelatinização mais rápido e mais lento respetivamente. A percentagem de retrogradação ( $R$ ) demonstrou que existem diferenças na estabilidade dos amidos gelatinizados e armazenados sob refrigeração e, dentre os amidos analisados, o menos estável durante todo o período de análise foi o amido da variedade MPA. Estes resultados obtidos, quer da gelatinização quer da retrogradação, indicam estar relacionados com diferenças estruturais como, por exemplo, o comprimento das duplas hélices da amilopectina (evidenciados através da  $T_p$ ) podendo-se ponderar uma relação entre o comprimento e a distribuição dos tamanhos das cadeias de amilopectina com as temperaturas de transição e com a retrogradação resultante (amidos com cadeias mais longas resultando em maiores temperaturas de transição e maior retrogradação e vice-versa).

A análise dos espectros (MID-IR) permitiu a identificação das principais bandas que formam o perfil dos amidos, para além da observação da heterogeneidade entre as réplicas espectrais em função da ordem de aquisição, que foi associada à absorção da humidade presente no meio de análise (aumento da intensidade a  $1643\text{ cm}^{-1}$  e diminuição a  $999\text{ cm}^{-1}$ ). A influência da água nesta região já havia sido observada através do MID-IR, porém ainda não relatada entre as réplicas espectrais e sim em amidos analisados sob diferentes teores de hidratação. A aplicação da análise multivariada, através da análise em componentes principais (PCA), confirmou este comportamento do amido. Verificou-se que a diferença entre estas intensidades podem ser utilizadas como uma possível estimativa da capacidade de absorção de água pelo grânulo.

O estudo do comportamento reológico, através de ensaios de varrimento em temperatura, demonstrou as alterações nas propriedades viscoelásticas das suspensões de amido durante o processo de gelatinização (aquecimento) e retrogradação (arrefecimento) com a formação de géis nas duas concentrações de amido que foram analisadas (10 e 20%). Foi observada a influência da concentração (aumento dos módulos com a concentração do sistema e diminuição das temperaturas de início do processo de gelatinização) e da estrutura granular nos perfis reológicos dos amidos. As curvas obtidas durante o aquecimento demonstram que as ligações de hidrogénio, existentes entre os componentes macromoleculares do amido, rompem-se com maior facilidade nos amidos crioulos quando comparados ao amido comercial, resultando em menores  $G'_{\text{máx.}}$  e menores temperaturas de pico. A estruturação dos géis durante o arrefecimento foi influenciada por estas diferenças estruturais, que conduziram a diferentes extensões de desintegração granular e lixiviação da amilose e da amilopectina, e demonstraram a influência negativa dos grânulos remanescentes na agregação das moléculas de amilose (dependente da concentração do sistema). Nos ensaios de varrimento em frequência de oscilação (espectro mecânico) observou-se que independente da concentração, o módulo elástico ( $G'$ ) foi superior ao módulo viscoso ( $G''$ ) para todos os amidos gelatinizados durante toda a gama de frequência analisada ( $G' > G''$ ) caracterizando os sistemas como típicos de géis e com maiores módulos de acordo com o aumento da concentração de amido. Em relação à força dos géis formados observou-se clara diferença de acordo com a concentração de amido no sistema. Com 10% de concentração de amido observou-se a formação de géis fracos, com

## ***Capítulo 2 – Caracterização dos Amidos***

ocorrência de rearranjos moleculares, e a 20% houve a formação de estrutura rígida traduzindo-se em géis fortes.

Desse modo, visto que a composição química dos amidos não apresentou grande diferença entre as variedades crioulas, verifica-se que a estrutura destes biopolímeros está ligada aos fatores que regem as diferenças observadas entre os mesmos como, por exemplo, a força das ligações de hidrogénio dentro dos grânulos, em termos de organização granular e comprimento das cadeias que formam a sua estrutura. Através desta caracterização, foram alcançados os objetivos frente aos agricultores da cidade de Anchieta e abre-se um novo caminho que gera perspectivas de direcionamento destas matérias-primas pela existência do potencial uso dos amidos destas variedades de milho crioulo para aplicação industrial.







***Capítulo 3***- Influência de um Polissacarídeo  
Catiônico, a Quitosana, na Gelatinização e  
Retrogradação do Amido

---



### **3.1 INTRODUÇÃO**

De acordo com o já mencionado no presente trabalho, o amido é comumente utilizado em produtos alimentares industriais, conferindo diferentes texturas, e a sua utilização implica no conhecimento do comportamento das pastas e/ou dos géis formados, assim como no conhecimento das alterações das suas propriedades funcionais devido à interação com outros ingredientes.

Este capítulo foi direcionado para o estudo da influência de um polissacarídeo catiónico, a quitosana, sobre determinadas propriedades funcionais do amido, nomeadamente a gelatinização e a retrogradação. A quitosana é um biopolímero amplamente utilizado em variadas áreas (Kumar, 2000; Damian *et al.*, 2005; Rinaudo, 2006; Azevedo *et al.*, 2007; Pillai *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010), como já referido anteriormente (capítulo 1, item 1.2.1). O interesse por este biopolímero é devido à presença de grupos amino livres, os quais lhe conferem características específicas. O facto de a quitosana ser solúvel em meios acidificados, nos quais ocorre a sua protonação, torna ainda mais interessante o estudo de sistemas mistos com o amido, possibilitando o desenvolvimento de novas funcionalidades em sistemas a baixo pH.

A mistura de diferentes hidrocolóides em sistemas alimentares e o estudo das interações que entre eles se estabelecem são importantes devido a obterem-se propriedades funcionais que muitas vezes são diferentes daquelas que caracterizam cada hidrocolóide individualmente, permitindo uma maior margem de manipulação das formulações com a possibilidade de criação de produtos alimentares diferenciados, obtenção de propriedades pretendidas (alteração das texturas, estabilidade e tempos de prateleira) e uma melhor compreensão dos sistemas alimentares que geralmente são multicomponentes onde naturalmente existem distintas macromoléculas.

Acerca da influência de outros hidrocolóides sobre a funcionalidade do amido já foram realizados diversos estudos e o assunto foi alvo de trabalhos de revisão (Appelqvist e Debet, 1997; BeMiller, 2011; Funami, 2011), sendo que este tópico foi abordado no capítulo 1 desta tese (item 1.3), pelo que aqui se discutem principalmente os trabalhos

realizados acerca do efeito da quitosana sobre as propriedades funcionais do amido.

A maior parte dos trabalhos realizados acerca de misturas de amido e quitosana teve como objetivo estudar as propriedades de filmes obtidos a partir destes dois biopolímeros, principalmente para diminuição da permeabilidade ao vapor de água, normalmente elevada para filmes de cada biopolímero isolado, e devido às propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana, fator que a torna um material em ascensão utilizado no revestimento de diversos alimentos, proporcionando aumento do tempo de prateleira destes produtos (Xu *et al.*, 2005; Bourtoom e Chinnan, 2008; Dutta *et al.*, 2009; Aider, 2010; Tuhin *et al.*, 2012; Bonilla *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013).

Apesar de serem bastante escassas, foram recentemente descritas abordagens envolvendo sistemas mistos de quitosana e amido com relação ao estudo das propriedades reológicas de pastas e/ou géis formados e também dos efeitos sobre outras propriedades funcionais do amido. Serrero *et al.* (2010) realizaram um estudo com sistemas mistos de quitosana e amido de batata modificado (maltodextrinas), oxidado e não oxidado, e analisaram o comportamento reológico e as interações ocorridas, também através de ensaios reológicos dinâmicos, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Através dos ensaios reológicos os autores observaram que diferentes respostas são obtidas dependendo das condições de preparação (concentração de quitosana, pH, grau de oxidação do amido). No caso do amido não oxidado não foram observadas diferenças no comportamento reológico em solução, comparando o sistema misto com a quitosana isolada, sendo sugerida a não ocorrência de reação química ou associação física entre os biopolímeros nestas condições. É de realçar que a concentração de amido estudada foi de apenas 1,4% para uma concentração de quitosana de 2,3% (pH 4). No entanto, modificações no comportamento reológico foram observadas quando o amido oxidado foi utilizado, nomeadamente um aumento dos módulos viscoelásticos destes sistemas mistos com a quitosana, as quais foram atribuídas à presença dos grupos aldeídos neste amido. Diminuindo os grupos aldeídos as alterações foram restringidas. A partir da análise por FTIR verificou-se que os picos referentes aos grupos aldeídos do amido oxidado não foram detetados no sistema misto com a quitosana devido à interação ocorrida. Com estas observações, os autores sugeriram que a presença dos grupos aldeídos do amido oxidado

foi essencial para a formação de rede entre a quitosana e o amido à custa de ligações covalentes (via reação de Schiff).

Horn *et al.* (2011) estudaram sistemas constituídos por amido de milho normal, amido gelatinizado ou amido oxidado (2%), com quitosana (1%), utilizando ensaios reológicos e espectroscopia de infravermelho médio para analisar o comportamento viscoelástico desses sistemas e as interações ocorridas entre os dois biopolímeros. Estes autores observaram que a adição da quitosana aos amidos modificados resultou em géis com maiores módulos viscoelásticos, quando comparados ao amido não modificado, indicando que as modificações no amido permitiram o aumento da formação de ligações de hidrogénio entre os biopolímeros. O sistema misto com o amido oxidado resultou no maior aumento dos módulos viscoelásticos e na formação de um pico adicional a  $1650\text{ cm}^{-1}$  no espectro de infravermelho, sugerindo que as maiores alterações no comportamento reológico observadas para este sistema se devem à interação entre os grupos dialdeídos do amido oxidado e os grupos amino da quitosana (via reação de Schiff), sendo que nos outros sistemas nenhuma alteração na análise espectroscópica foi observada.

Xu *et al.* (2012) estudaram sistemas mistos de amido de milho normal com diferentes polissacarídeos, incluindo a quitosana. Realizaram análises viscosimétricas para avaliarem a formação das pastas de amido na presença desses polissacarídeos e analisaram o seu efeito sobre as propriedades funcionais do amido (gelatinização e retrogradação) através de análises térmicas. Os resultados demonstraram aumento da viscosidade do sistema para uma proporção de quitosana correspondente a 5%. Através das análises térmicas este estudo mostrou também que, nas concentrações estudadas, não ocorreu alteração nas temperaturas de transição e entalpias e que a retrogradação do amido, após 7 e 30 dias de armazenamento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , não foi inibida com a adição da quitosana, efeito este explicado pela possível separação de fases entre a quitosana e a amilose lixiviada.

A adição de outros biopolímeros ao amido é comprovadamente capaz de alterar as suas propriedades com a formação de diferentes estruturas e, por vezes, pode ocasionar resultados desejáveis como a diminuição ou retardo da retrogradação que frequentemente interfere de forma negativa nas propriedades do produto final. Os trabalhos realizados com

misturas de quitosana e amido, em condições propícias à formação de pastas de elevada viscosidade e de géis são escassos, como se discutiu anteriormente. Os poucos trabalhos encontrados utilizam o amido em baixas concentrações e estão enfatizados no uso de amido modificado e/ou não abrangem um estudo da mistura destes hidrocolóides sobre os processos de gelatinização e retrogradação. No presente trabalho foram utilizados ensaios reológicos para verificar as alterações que ocorrem no amido durante o aquecimento e arrefecimento, conduzindo à compreensão do comportamento viscoelástico resultante, observação do desenvolvimento estrutural durante a maturação destes sistemas mistos, complementados com análise térmica, microscopia e espectroscopia de infravermelho. Os ensaios foram realizados em meio aquoso acidificado com ácido acético em duas concentrações molares (0,1 e 1 mol/L), para desta maneira conseguir analisar o que ocorre entre a quitosana e o amido em diferentes condições de pH. Como as proporções entre os constituintes e o meio em que os processos de gelatinização e retrogradação ocorrem podem afetar diretamente nas propriedades resultantes de um sistema misto, este capítulo envolveu formulações com diferentes concentrações de quitosana (0,1 – 2% (m/m)), mantendo a concentração de amido em 20% (m/m). De acordo com o que foi relatado anteriormente, existe uma lacuna científica neste aspeto e através da introdução da quitosana em alimentos à base de amido, podem ser conseguidas propriedades funcionais diversificadas e talvez melhoradas.

Assim, a interação da quitosana com o amido e os efeitos sobre os processos de gelatinização e retrogradação foram avaliados abordando os seguintes aspetos:

(1) Estudo do comportamento reológico dos sistemas, utilizando ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação, incluindo: (a) ensaios de varrimento em temperatura e medição dos módulos viscoelásticos durante o ciclo de aquecimento (gelatinização) e durante o ciclo de arrefecimento (retrogradação - estruturação de pastas e/ou géis formados); (b) ensaios de varrimento em frequência de oscilação para avaliar as propriedades viscoelásticas finais de pastas e/ou géis formados (realizados após varrimento em temperatura e tempo); e (c) ensaios de varrimento em tempo (maturação) para avaliação das alterações estruturais com relação ao tempo (estabilização, enfraquecimento ou fortalecimento da estrutura formada);

(2) Estudo da microestrutura dos sistemas mistos de amido/quitosana em comparação com os amidos controlos, antes e após o processo de gelatinização, recorrendo-se essencialmente à microscopia eletrónica de varrimento (MEV);

(3) Análise da interação do amido e da quitosana através da espectroscopia de infravermelho (MID-IR);

(4) Estudo do efeito da quitosana sobre as propriedades térmicas do amido (através do DSC), avaliando o processo de gelatinização e de retrogradação (7, 14 e 40 dias de armazenamento a 4 °C).

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Materiais

Para esta etapa da pesquisa foi selecionado o amido de milho da variedade crioula MPA 01 (MPA), variedade mais representativa em nível de cultivo, e o amido comercial (COM) Maizena® (Unilever Jerônimo Martins Lda.), amostras já caracterizadas no capítulo 2 desta tese. Foi utilizada a quitosana (Q) comercial em pó de casca de caranguejo (Sigma-Aldrich®) que de acordo com dados fornecidos pelo fabricante possui grau de acetilação entre 15 e 25% e baixa massa molecular ( $\approx 50.000$  com base na viscosidade). O ácido acético (AcOH) utilizado também foi da marca Sigma-Aldrich® ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  - Cat. # 49199).

### 3.2.2 Métodos

#### 3.2.2.1 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)

O grau de acetilação da quitosana utilizada neste trabalho foi determinado por espectroscopia de infravermelho (MID-IR). Para a aquisição dos espectros, uma pequena quantidade de quitosana foi previamente acondicionada em exsiccador na presença do dessecante pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) durante sete dias. As análises foram realizadas no espectrofotômetro IFS55 (Bruker®) com acessório de ATR de reflexão única (Golden-Gate). Foram adquiridos cinco espectros na forma de absorvância ( $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ ), com resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 128 varrimentos. Após a aquisição de cada espectro a amostra foi trocada para não sofrer influência da humidade presente no meio ambiente de análise. A determinação do grau de acetilação foi efetuada como anteriormente descrito (Santos *et al.*, 2006), recorrendo à equação proposta por Baxter *et al.* (1992) a qual utiliza as intensidades de absorvância das bandas de IR a  $1655$  e  $3450\text{ cm}^{-1}$  (banda de prova e de referência, respetivamente) para calcular o grau de acetilação (equação 3.1):

$$\text{Grau} = \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \quad (\text{equação 3.1})$$



### **3.2.2.2 Preparação dos Sistemas Mistos de Amido e Quitosana**

Para a preparação dos sistemas mistos a concentração final de amido foi estabelecida a 20% (m/m), variando-se a concentração adicionada de quitosana. Como já anteriormente referido (capítulo 1, item 1.2.1), a quitosana é solúvel em soluções aquosas ácidas, sendo mais frequentemente utilizado o ácido acético, numa concentração entre 0,1 a 0,5 mol/L. Devido a este facto, os sistemas mistos amido-quitosana foram preparados usando como solvente o ácido acético a 0,1 mol/L. Para comparação e para avaliar as respostas em meios com diferente acidez, também foram elaborados sistemas mistos solubilizados em AcOH 1 mol/L e, neste caso, foi escolhido o amido comercial (COM) devido à sua maior disponibilidade (analizados através da reologia, MEV e MID-IR).

Foram elaboradas misturas para obter as seguintes concentrações finais de quitosana nos sistemas mistos: 0.1, 0.3, 0.5 e 1% (m/m). A concentração final de 2% (m/m) foi acrescentada quando a quitosana foi solubilizada em AcOH 1 mol/L.

*Preparação da solução de quitosana:* realizou-se a solubilização deste biopolímero em ácido acético (0,1 ou 1 mol/L) sob agitação magnética moderada à temperatura ambiente durante 12 horas e na sequência a solução foi centrifugada (os sedimentos foram descartados). A partir de uma aliquota desta solução de quitosana foi determinado o resíduo seco (105 °C, 12 h), como estimativa da quantidade de quitosana dissolvida, e o restante foi utilizado para a preparação dos sistemas mistos.

*Preparação dos sistemas mistos:* as amostras de amido foram suspensas em ácido acético 0,1 ou 1 mol/L e permaneceram sob agitação magnética lenta, à temperatura ambiente, durante 1 hora. Seguidamente foram aos poucos adicionadas às soluções de quitosana, sob agitação, preparadas no mesmo solvente para obtenção das concentrações finais desejadas. Os sistemas mistos ficaram em agitação sob vácuo por mais 1 hora (importante para a remoção de eventuais bolhas de ar). Suspensões dos amidos (20% m/m) em AcOH (0,1 ou 1 mol/L) foram utilizadas como controlos e deixadas em agitação lenta durante 2 horas antes das análises.

### **3.2.2.3 Caracterização do Comportamento Reológico**

Para o estudo do comportamento reológico dos sistemas mistos (amido/quitosana) os ensaios foram conduzidos da mesma maneira e com a utilização do mesmo reómetro de tensão controlada descrito no capítulo 2 (item 2.2.2.16) (sistema de placas paralelas, placa rugosa, 4 cm de diâmetro, 1.0 mm de gap - Bohlin®, CVO 120 HR).

Após um ciclo de aquecimento/arrefecimento (40-90-20 °C) foram realizados os ensaios preliminares de varrimento de tensão oscilatória, com a utilização de uma frequência constante de 2 rad/s, para determinar a região viscoelástica de comportamento linear dos sistemas mistos em estudo. Através dos resultados optou-se por utilizar uma amplitude de deformação de 1% para todos os ensaios.

Para a caracterização das misturas realizaram-se três tipos de ensaios reológicos dinâmicos: ensaios de varrimento em temperatura (aquecimento e arrefecimento), ensaios de varrimento em frequência de oscilação e ensaios de varrimento em tempo.

Nos ensaios de varrimento em temperatura os sistemas mistos foram submetidos a aquecimento de 40 °C a 90 °C, mantidos a esta temperatura durante 10 minutos e arrefecidos de 90 °C a 20 °C, a uma taxa de variação de temperatura de 1 °C/min, frequência de oscilação de 2 rad/s e amplitude de deformação de 1%.

Seguidamente ao arrefecimento, o comportamento viscoelástico dos sistemas mistos foi analisado através de ensaios de varrimento em frequência de oscilação realizados numa gama de frequências entre 0.01 e 10 rad/s, a uma temperatura constante de 20 °C e 1% de deformação. Após o ensaio de varrimento em frequência de oscilação realizou-se um ensaio de varrimento em tempo também a 20 °C, durante 15 horas, para verificar possíveis alterações estruturais durante este período de maturação das pastas ou géis obtidos. Ao fim deste período de tempo realizou-se um novo ensaio de varrimento em frequência de oscilação (nas mesmas condições anteriores).

Os parâmetros reológicos de interesse foram o módulo elástico ( $G'$ ) e o módulo viscoso ( $G''$ ).

#### **3.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV)**

Os sistemas mistos (amido/quitosana), antes e após a gelatinização no reômetro, foram congelados e liofilizados para a análise da estrutura através da microscopia eletrônica de varrimento. Para a referida análise as amostras foram colocadas em suportes de alumínio (*stubs*), recobertas com uma película de carbono em equipamento de deposição de carbono (Emitech® K950) e observadas no Microscópio Eletrônico de Varrimento (SU70, Hitachi®). Foram utilizadas ampliações de 200, 700 e 2500 vezes, sob aceleração de voltagem de 15 kV.

#### **3.2.2.5 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)**

Para verificar se ocorreram interações entre o amido e a quitosana os sistemas mistos, congelados e liofilizados, quer antes quer após a gelatinização realizada no reômetro, foram analisados através da espectroscopia de infravermelho utilizando o mesmo equipamento citado no item 3.2.2.1 deste capítulo.

Todos os espectros foram adquiridos na forma de absorvância ( $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ ), com resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 128 varrimentos. Utilizou-se uma porção suficiente das amostras (armazenadas em exsiccador) para cobrir a célula do acessório de ATR. Após a aquisição de cada espectro estas foram remexidas realizando-se nova aquisição. Cada sistema misto foi analisado cinco vezes com a realização de um branco a cada troca de amostra (*background*). A análise dos espectros obtidos realizou-se com o *software* OPUS® (versão 5.0).

#### **3.2.2.6 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)**

##### **3.2.2.6.1 Efeito da Quitosana na Gelatinização do Amido**

A adição da quitosana ao amido e seus efeitos no processo de gelatinização foram estudados utilizando as mesmas cápsulas e o mesmo calorímetro descrito no capítulo 2 item 2.2.2.13.1 (*Perkin-Elmer® Diamond DSC*).

Após a preparação, os sistemas mistos foram inseridos nas cápsulas de alumínio ( $\pm 20$  mg) e realizadas as análises nas seguintes condições: atmosfera de azoto com fluxo de 40 mL/min, taxa de aquecimento 10 °C/min, temperatura inicial 20 °C e temperatura final 90 °C. Os parâmetros térmicos foram calculados como descrito no capítulo 2 e incluíram: temperatura inicial ( $T_0$ ), temperatura de pico ( $T_p$ ), temperatura de conclusão ( $T_c$ ), entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ), faixa de temperatura de gelatinização ( $R_{gel}$ ) e índice de altura do pico ( $PHI$ ).

#### *3.2.2.6.2 Efeito da Quitosana na Retrogradação do Amido*

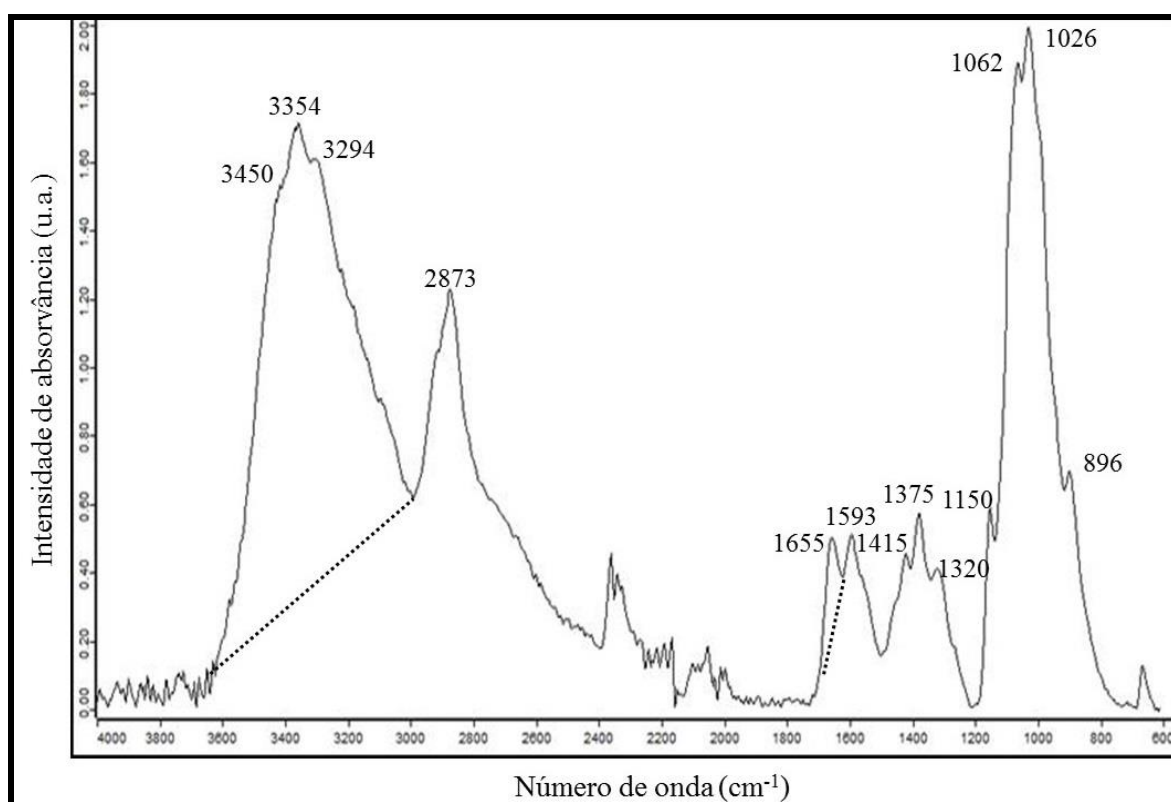
Para analisar a influência da quitosana na retrogradação do amido as cápsulas com os sistemas mistos gelatinizados foram armazenadas durante 7, 14 e 40 dias, a 4 °C, e novamente submetidas à análise no calorímetro. Antes das análises as cápsulas foram deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente e reaquecidas em condições iguais as utilizadas durante a gelatinização. Os parâmetros térmicos foram os mesmos e calculados igualmente ao descrito no capítulo 2.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)

Como já referido, o grau de acetilação exerce grande influência na reatividade e solubilidade da quitosana. É o principal parâmetro que reflete nas propriedades e comportamentos deste biopolímero (Kasaai, 2008) sendo uma das mais importantes características químicas através da qual é determinado o conteúdo de grupos amino livres (Khan *et al.*, 2002).

A Figura 3.1 mostra o perfil espectral da quitosana com a representação das linhas de base utilizadas para calcular o grau de acetilação através da intensidade de absorvância das bandas a 3450 e 1655  $\text{cm}^{-1}$  (correspondentes aos grupos OH e amida I, respetivamente).



**Figura 3.1:** Perfil do espectro de MID-IR da quitosana em pó. Média de cinco espectros entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$  normalizados e com correção de linha de base (OPUS 5.0®).

Diferentes bandas do IR são propostas para esta determinação (com diferentes linhas de base) sendo adequadas para determinadas gamas de grau de acetilação (Kasaai, 2008). No caso do presente trabalho, e com base no valor indicado pelo fornecedor da quitosana utilizada, foi escolhida a equação 3.1 indicada para amostras com graus de acetilação entre 15 e 80%. Para a sua aplicação é necessário obter os espectros da amostra seca, em virtude da influência da humidade nas bandas utilizadas para o cálculo do grau de acetilação (Kasaai, 2008). Desta forma o grau de acetilação da amostra de quitosana em uso no presente trabalho foi determinado obtendo como resultado  $25.9\% \pm 0.5$  (o que está de acordo com os dados do fornecedor, entre 15 e 25%).

Nesta etapa do trabalho, aproveitou-se para identificar as principais bandas de absorvância da quitosana obtidas pelo MID-IR (Figura 3.1). O espectro é similar ao apresentado em outros trabalhos de acordo com o referenciado a seguir. Uma banda larga é observada entre  $3600$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , com intensidades máximas de absorvância em  $3354$  e  $3294\text{ cm}^{-1}$ , devido à sobreposição das vibrações dos alongamentos dos grupos O-H e N-H, respetivamente (dos Santos *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Kasaai, 2008; de Vasconcelos *et al.*, 2006; Serrero *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2011; Nanaki *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Entre os números de onda  $3000$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$  (intensidade máxima de absorvância em  $2873\text{ cm}^{-1}$ ) observa-se a vibração devido aos alongamentos de grupos C-H (Kasaai, 2008; Serrero *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013).

Na região do espectro entre  $1700$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  aparecem duas bandas com intensidades máximas de absorvância em  $1660$  e  $1594\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas correspondem à amida I (alongamentos de grupos C=O) e amida II (deformações de grupos N-H), respetivamente (dos Santos *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; de Vasconcelos *et al.*, 2006; Bourtoom e Chinnan, 2008; Zhong *et al.*, 2011; Nanaki *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

A região espectral entre  $1500$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  apresentou três máximos de absorção ( $1415$ ,  $1375$  e  $1320\text{ cm}^{-1}$ ) que podem ser associados a sobreposição de deformações e balanços de grupos CH e OH e com a deformação axial de CN de grupos amino (Kasaai 2008; Serrero *et al.*, 2010; Nanaki *et al.*, 2012).

Entre 1200 e 800  $\text{cm}^{-1}$  encontram-se as bandas associadas com as vibrações de estiramento dos grupos C-OH laterais e a ligação glucosídica (C-O-C) (Kasaai 2008; de Vasconcelos *et al.*, 2006; Serrero *et al.*, 2010; Nanaki *et al.*, 2012). A identificação das bandas espectrais da quitosana é posteriormente utilizada para discussão dos resultados no item 3.3.4.

### **3.3.2 Caracterização do Comportamento Reológico**

O comportamento reológico dos sistemas mistos amido/quitosana foi analisado recorrendo-se a três tipos de ensaios: varrimento em temperatura, varrimento em frequência de oscilação e varrimento em tempo. Após o varrimento em tempo realizou-se novamente um varrimento em frequência de oscilação.

De acordo com o anteriormente mencionado, quer os sistemas mistos de amido/quitosana quer os controlos (suspensões de amido) foram preparados em meios aquosos acidificados com ácido acético (devido à solubilidade da quitosana). No entanto, suspensões a 20% de amido em água foram também comparadas com as suspensões em AcOH a 0,1 e 1 mol/L, para avaliar o efeito da diminuição do pH e da presença do ácido orgânico sobre o comportamento reológico e gelatinização do amido.

Em muitos alimentos a adição de substâncias ácidas é utilizada pela indústria com o propósito de acidificação ou conservação sendo bastante usuais os ácidos acético, cítrico, málico, tartárico, ascórbico e láctico (Hirashima *et al.*, 2005). Quando a gelatinização do amido é efetuada diretamente em meio aquoso acidificado diferentes texturas podem ser obtidas em comparação com o amido gelatinizado em meio não acidificado. O trabalho realizado por Ohishi *et al.* (2007) teve precisamente o objetivo de avaliar as alterações ocasionadas na textura quer da farinha quer do amido de arroz gelatinizados com o ácido acético (0,2 mol/L) em comparação com o meio não acidificado. De acordo com as observações dos autores, a presença do ácido para além de promover um maior poder de inchamento dos grânulos (principalmente acima dos 60 °C) e de facilitar a gelatinização do amido, aumentou a viscosidade das pastas num primeiro estágio da análise viscosimétrica e, devido a agitação exercida sobre as amostras durante os testes, a viscosidade final

diminuiu. Kasai *et al.* (2001) utilizaram o ácido acético (entre 0,05 e 0,2 mol/L) para o cozimento de arroz e observaram, através de análises em um texturômetro, que ocorreu diminuição na dureza e aumento na viscosidade de acordo com o aumento da concentração do AcOH. Hirashima *et al.* (2005) utilizaram diversos ácidos orgânicos para gelatinizar o amido de milho e observaram quer o aumento quer a diminuição da viscosidade das pastas obtidas, sendo estas diferenças atribuídas ao pH do meio e não em função do tipo de ácido.

### **3.3.2.1 Varrimento em Temperatura**

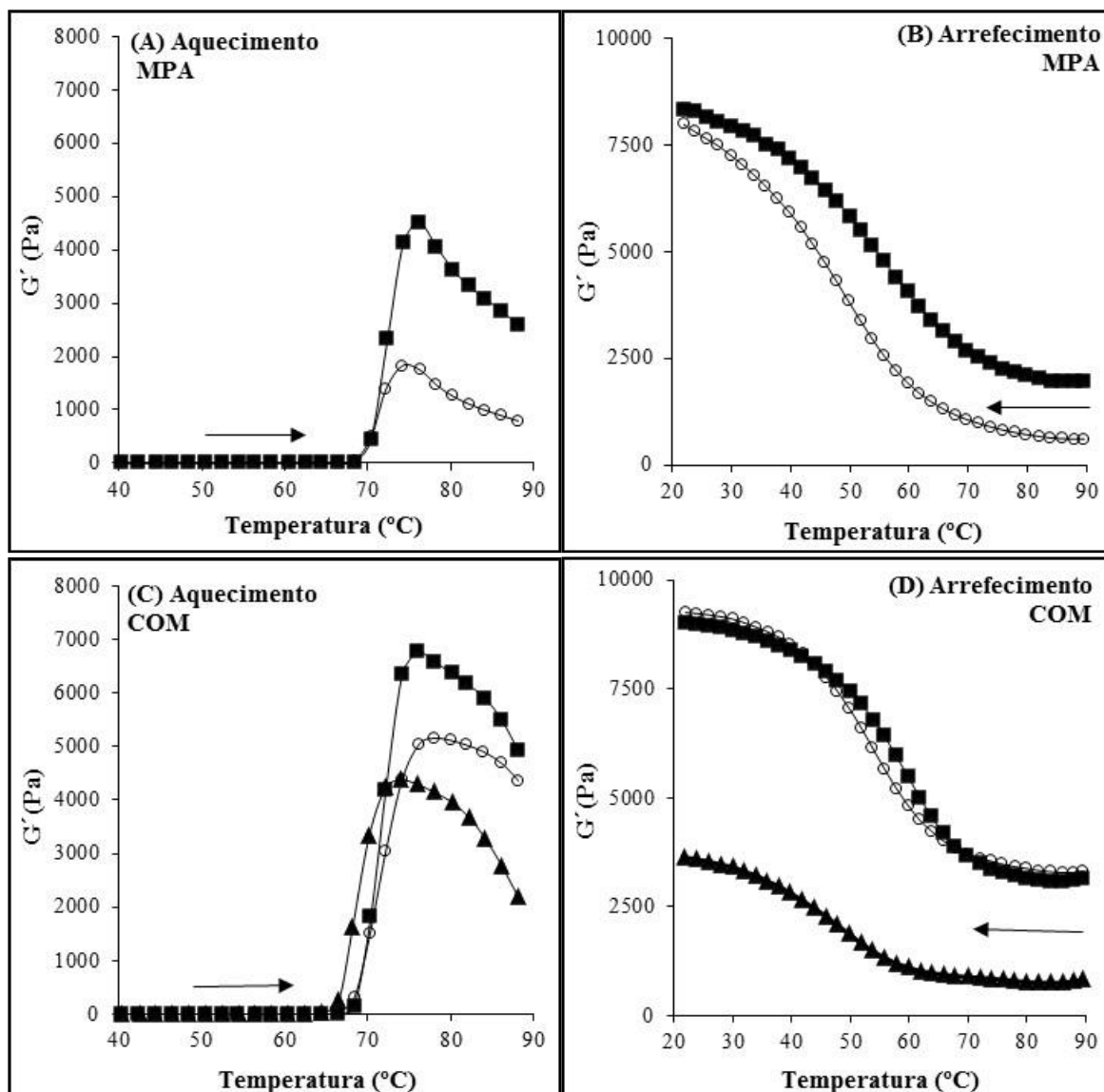
#### **3.3.2.1.1 Efeito da Diminuição do pH (presença de ácido acético)**

A Figura 3.2 apresenta a comparação do comportamento do amido em meio aquoso e nos meios aquosos acidificados com 0,1 e 1 mol/L de AcOH.

Em uma análise geral, observa-se que dependendo do meio no qual o amido foi suspenso para a gelatinização, foram obtidas curvas diferentes durante os ciclos de aquecimento e arrefecimento. No ciclo de aquecimento, os amidos MPA e COM em AcOH 0,1 mol/L (Figura 3.2 A e C) apresentaram curvas concordantes entre si, com maiores  $G'_{\text{máx}}$  (correspondente ao ponto máximo da curva onde inicia a rutura granular) do que em água, o que estará associado a um maior inchamento dos grânulos de amido em ácido acético quando comparados ao meio aquoso, embora apresentem uma estruturação similar durante o ciclo de arrefecimento com valores finais de  $G'$  a 20 °C muito semelhantes (Figura 3.2 B e D).

Entretanto, o contrário foi observado para o amido COM em AcOH 1 mol/L. Quer no aquecimento (Figura 3.2 C) quer no arrefecimento (Figura 3.2 D) as curvas foram menores na presença do ácido e o valor de  $G'$  a 20 °C foi significativamente inferior, quando comparado ao sistema não acidificado ou em AcOH 0,1 mol/L. Estas diferenças estão relacionadas com a influência que o pH do meio exerceu sobre a estrutura dos grânulos de amido e que é refletida no perfil reológico, conforme é na sequência discutido.





**Figura 3.2:** Curvas médias da evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da temperatura, para os amidos MPA e COM em suspensão a 20% (m/m). Frequência de oscilação de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . (○) Água (pH  $\approx$  6.0), (■) AcOH 0,1 mol/L (pH  $\approx$  3.0), (▲) AcOH 1 mol/L (pH  $\approx$  2.4).

As mudanças que ocorrem no amido em presença de calor e meio aquoso, e que refletem no perfil reológico, já foram discutidas no capítulo 2 (item 2.3.9.1) assim como já foram definidos os parâmetros obtidos com base na variação do módulo elástico durante o aquecimento e que são novamente utilizados (TG, TP e  $G'_{\text{máx}}$ ). Para a análise destes parâmetros e para a discussão das curvas observadas na Figura 3.2, quer no aquecimento quer no arrefecimento dos amidos nos diferentes meios, primeiramente é preciso compreender o que o ácido pode ocasionar no amido. É de conhecimento comum que o

amido pode ser hidrolisado com a adição de ácidos e sob determinadas condições. A extensão da hidrólise pode ser controlada através da concentração do ácido, tempo de reação e temperatura, ocorrendo inicialmente na zona amorfa do grânulo, resultando em fragmentos menores, e consequentemente diminuição da massa molecular. O tratamento prévio do amido com ácidos diluídos (geralmente HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em temperaturas abaixo da gelatinização) é amplamente utilizado para produzir amidos modificados (hidrolisados) que apresentam diferenças nas propriedades físico-químicas, térmicas e reológicas. As propriedades destes amidos ácido-modificados variam e geralmente apresentam aumento da solubilidade e decréscimo da viscosidade mas divergem em parâmetros como, por exemplo, propriedades térmicas, percentagem de retrogradação e força do gel (também dependem do tipo de amido) (Wang *et al.*, 2003; Sandhu *et al.*, 2007; Gunaratne e Corke, 2007; López *et al.*, 2010; Ahmed e Auras, 2011; Abdorreza *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2003) compararam a força dos géis de amido sem prévio tratamento ácido com amidos ácido-modificados e observaram que aumentando a concentração do ácido utilizado no tratamento do amido a força dos géis diminuiu e este resultado foi atribuído à menor massa molecular da amilose devido ao tratamento ácido, à semelhança do observado por Abdorreza *et al.* (2012) em amido de sagu. De acordo com Sandhu *et al.* (2007) estes amidos podem ser utilizados em concentrações mais elevadas sem ocasionar um espessamento em excesso.

No presente trabalho os amidos não foram previamente hidrolisados por tratamento ácido, entretanto foram gelatinizados diretamente em soluções ácidas e neste processo, com o aquecimento, também tem sido reportada a ocorrência da hidrólise, em diferentes extensões, dependendo da concentração molar do ácido (pH). Neste tipo de estudo, diversos ácidos já foram utilizados para suspender e gelatinizar o amido e associados com a ocorrência de hidrólise como, por exemplo, o ácido clorídrico em amido de inhame (Mali *et al.*, 2003) e o cítrico em amido de milho (Hirashima *et al.*, 2012), ambos em suspensões com pH 3.0. Hirashima *et al.* (2005) utilizaram os ácidos cítrico, acético, láctico, málico, tartárico e ascórbico (pH entre 2.4 e 6.0) adicionados antes e após a gelatinização para analisar as alterações ocasionadas no amido de milho. Os autores observaram, através da viscosidade intrínseca dos amidos gelatinizados na presença destes ácidos que, por exemplo, em pH abaixo de 3.4 o amido foi hidrolisado em determinada

extensão, porém em pH abaixo de 2.7 a hidrólise ocorreu em grande extensão diminuindo expressivamente o tamanho das cadeias de amido (independente do tipo de ácido). Correlacionando as informações supracitadas com o presente trabalho é de se esperar que ocorra este efeito do ácido acético sobre o amido durante a gelatinização, principalmente quando foi utilizado o AcOH a 1 mol/L (pH: 2.4) e estas informações são analisadas na sequência embasadas nos resultados obtidos com a reologia.

Na Tabela 3.1 estão apresentados os valores dos parâmetros reológicos, com base no módulo elástico, resultantes do ciclo de aquecimento: temperatura inicial do processo de gelatinização (TG),  $G'$  máximo ( $G'_{\text{máx}}$ ) que corresponde ao ponto máximo da curva e temperatura de pico (TP) que corresponde ao  $G'_{\text{máx}}$ , além dos respectivos valores de pH dos sistemas.

**Tabela 3.1:** Parâmetros obtidos com base na variação do módulo elástico, durante o aquecimento, dos amidos MPA e COM a 20% (m/m). Suspensões em água e ácido acético (0,1 e 1 mol/L) e valores de pH.<sup>1</sup>

	TG (°C)	TP (°C)	$G'_{\text{máx}}$ (kPa)	pH
<b>MPA (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>65.4 ± 0.9<sup>c</sup></b>	<b>75.2 ± 1.0<sup>b</sup></b>	<b>1.9 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>6.3 ± 0.1<sup>a</sup></b>
<b>MPA (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>64.0 ± 0.2<sup>bc</sup></b>	<b>76.3 ± 0.1<sup>c</sup></b>	<b>4.5 ± 0.6<sup>bc</sup></b>	<b>3.4 ± 0.0<sup>b</sup></b>
<b>COM (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>63.5 ± 1.0<sup>b</sup></b>	<b>78.0 ± 0.1<sup>d</sup></b>	<b>5.2 ± 0.2<sup>c</sup></b>	<b>5.2 ± 0.0<sup>c</sup></b>
<b>COM (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>64.1 ± 0.2<sup>bc</sup></b>	<b>76.2 ± 0.1<sup>c</sup></b>	<b>6.8 ± 0.9<sup>d</sup></b>	<b>3.0 ± 0.1<sup>d</sup></b>
<b>COM (AcOH 1 mol/L)</b>	<b>61.4 ± 1.7<sup>a</sup></b>	<b>74.2 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>4.3 ± 0.4<sup>b</sup></b>	<b>2.4 ± 0.0<sup>e</sup></b>

<sup>1</sup> Os valores apresentados correspondem à média de três valores ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

TG: temperatura inicial do processo de gelatinização, TP: temperatura de pico,  $G'_{\text{máx}}$ :  $G'$  máximo.

De acordo com os dados da Tabela 3.1, as temperaturas iniciais do processo de gelatinização (TG) não apresentaram diferenças significativas entre os amidos suspensos em água comparados com os amidos em AcOH a 0,1 mol/L. Todavia no amido suspenso em AcOH a 1 mol/L ocorreu uma diminuição da TG (significativamente inferior às outras TG). Estes resultados indicam que o aumento reversível do volume dos grânulos, que ocorre nesta fase até o alcance da TG, não foi expressivamente alterado com a variação do pH entre 3.0 e 6.3. Em oposição, através da diminuição observada na TG no meio com o

AcOH a 1 mol/L é possível inferir que nesta condição de pH (2.4) ocorreu um auxílio no aumento do volume granular na presença do ácido acético mais concentrado e, conseqüentemente, com a maior interação entre os grânulos neste sistema a TG foi alcançada para menores temperaturas. Assim, foi observado que a temperatura de início do processo de gelatinização foi significativamente alterada (diminuição) no sistema de amido com pH 2.4 e acima de 3.0 não houve influência significativa neste parâmetro. Wang e colaboradores (2003), que fizeram uma prévia modificação ácida no amido, mencionam que aumentando a concentração do ácido é possível que os íons hidrogénio estejam mais disponíveis para penetrar em maior proporção na parte amorfa do grânulo (fator que posteriormente nas análises realizadas ocasionou maior degradação da amilose e da amilopectina quanto mais ácido foi o tratamento). Na literatura, o efeito da diminuição do pH (presença de ácidos) sobre a temperatura de gelatinização de amidos é geralmente descrito através de ensaios realizados no DSC. Hirashima *et al.* (2012) gelatinizaram amido de milho em ácido cítrico (pH entre 3 e 5) e não observaram alterações na temperatura de gelatinização ( $T_0$ ), à semelhança do observado por Mali *et al.* (2003) que gelatinizaram amido de inhame acidificado com ácido clorídrico (pH entre 3 e 6), enquanto Ohishi *et al.* (2007) constataram que o amido de arroz gelatinizou mais facilmente na presença do ácido acético a 0,2 mol/L (pH 2.8) havendo uma diminuição de 1 °C na  $T_0$ . De realçar, no entanto, que esta temperatura crítica medida por DSC não está exatamente relacionada com o processo que se deteta pelo aumento brusco de  $G'$  durante o aquecimento da suspensão de amido, ou seja TG.

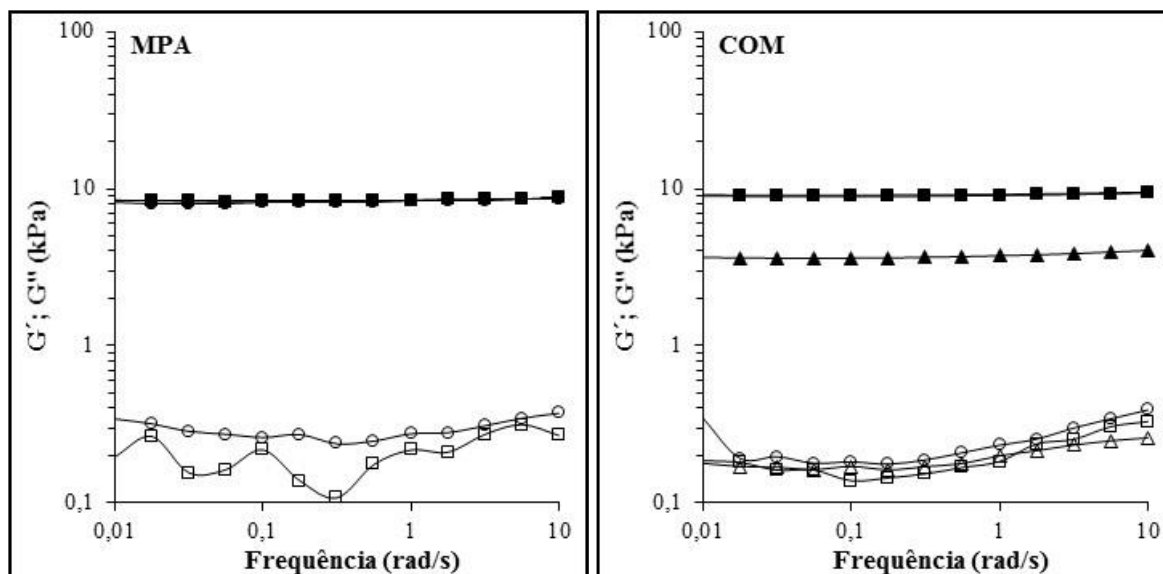
Quando comparados com o meio aquoso, os valores de  $G'_{\text{máx}}$  (Tabela 3.1) aumentaram na presença do AcOH a 0,1 mol/L e ocorreu uma diminuição em AcOH a 1 mol/L. O facto do  $G'_{\text{máx}}$  observado a 0,1 mol/L de AcOH ser superior ao  $G'_{\text{máx}}$  dos sistemas em água demonstra que o ácido, nesta concentração mais diluída, facilitou a rutura das ligações de hidrogénio (entre os componentes do amido) e o inchamento dos grânulos, com a formação de uma rede tridimensional com maior módulo elástico, antes do início da rutura dessas estruturas granulares por maior aumento da temperatura. Apesar desta diferença durante o aquecimento, no arrefecimento a estruturação foi semelhante entre o meio aquoso e com AcOH a 0,1 mol/L (observada através do aumento de  $G'$  e valores finais a 20 °C, Figura 3.2 B e D), o que demonstra que o pH entre 3.0 e 6.3 não

teve grande influência na estruturação que ocorre com a diminuição da temperatura. Por outro lado, com o AcOH a 1 mol/L, quer o  $G'_{\text{máx}}$  quer a temperatura de pico (TP) são inferiores neste sistema quando comparados ao meio não acidificado ou em AcOH 0,1 mol/L, para além do valor de  $G'$  ser significativamente inferior a 20 °C, após o arrefecimento (Figura 3.2 D). O perfil observado nas curvas de aquecimento e arrefecimento deste sistema pode ser correlacionado com a ocorrência de uma hidrólise parcial das cadeias de amido. Com a diminuição da massa molecular a lixiviação das cadeias do amido para fora do grânulo é facilitada (Ahmad e Williams, 1998), ocorrerá maior degradação dos grânulos, explicando o menor  $G'_{\text{máx}}$ , o início da rutura granular em temperatura inferior durante o ciclo de aquecimento e também o  $G'$  inferior obtido a 20 °C. Estes resultados podem ser relacionados com o trabalho de Gunaratne e Corke (2007) que observaram, sob aquecimento, que para baixas concentrações de ácido (HCl 0,1 mol/L) o inchamento dos grânulos é favorecido pela rutura das ligações de hidrogénio entre os polímeros que compõem o amido e que para maiores concentrações de HCl (0,5 e 1 mol/L) o inchamento decresce devido à “corrosão” que o ácido causa na região amorfa. Pode-se interpretar que até alcançar os 90 °C também ocorreu a lixiviação da amilopectina em maior extensão (Ohishi *et al.*, 2007) e este fator pode também correlacionar-se com o menor valor de  $G'$  e com a estruturação observada neste sistema durante o arrefecimento (Figura 3.2 D). Isto porque a amilose é a principal fração responsável pela formação do gel e a amilopectina é correlacionada com o enfraquecimento da formação desta estrutura por dificultar a associação das cadeias de amilose (Hansen *et al.*, 1991; Jane *et al.*, 1999). Assim, a presença de maior quantidade de amilopectina no meio juntamente com a diminuição da massa molecular das cadeias da amilose (possivelmente também da amilopectina) podem justificar o menor  $G'$  durante o arrefecimento, influenciando na estruturação. À semelhança do observado por Wang *et al.* (2003) e Abdorreza *et al.* (2012), em amidos hidrolisados, a estruturação ocorreu para temperatura mais baixa em comparação com o meio aquoso e com AcOH 0,1 mol/L devido à maior facilidade de hidratação dos grânulos e inchamento inicial, facilitando a estruturação da rede polimérica, apesar da lixiviação mais acentuada dos componentes do grânulo comprometer o processo de formação do gel com a diminuição subsequente da temperatura. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que correlacionam a diminuição da massa molecular do amido com a diminuição dos módulos viscoelásticos devido à hidrólise ácida (Abdorreza *et*

*al.*, 2012; Wang *et al.*, 2003; Ahmed e Auras, 2011; Hirashima *et al.*, 2005; Mali *et al.*, 2003). Assim, no presente trabalho a gelatinização do amido em solução de AcOH 1 mol/L, a pH 2.4, infere a ocorrência de hidrólise das cadeias do amido durante o processo de gelatinização resultando na diminuição do módulo elástico no ciclo de aquecimento e arrefecimento.

De maneira a complementar o observado no varrimento em temperatura também são apresentados, na Figura 3.3, os espectros mecânicos que foram realizados logo após o arrefecimento a 20 °C. O comportamento viscoelástico dos sistemas de amido em meio aquoso e na presença do ácido acético (0,1 e 1 mol/L) foi semelhante frente à variação da frequência de oscilação. O módulo elástico permaneceu independente da frequência aplicada e significativamente superior ao  $G''$ , caracterizando a formação de géis bem estruturados nos meios ácidos e no meio aquoso não acidificado ( $\tan \delta$  inferior a 1).

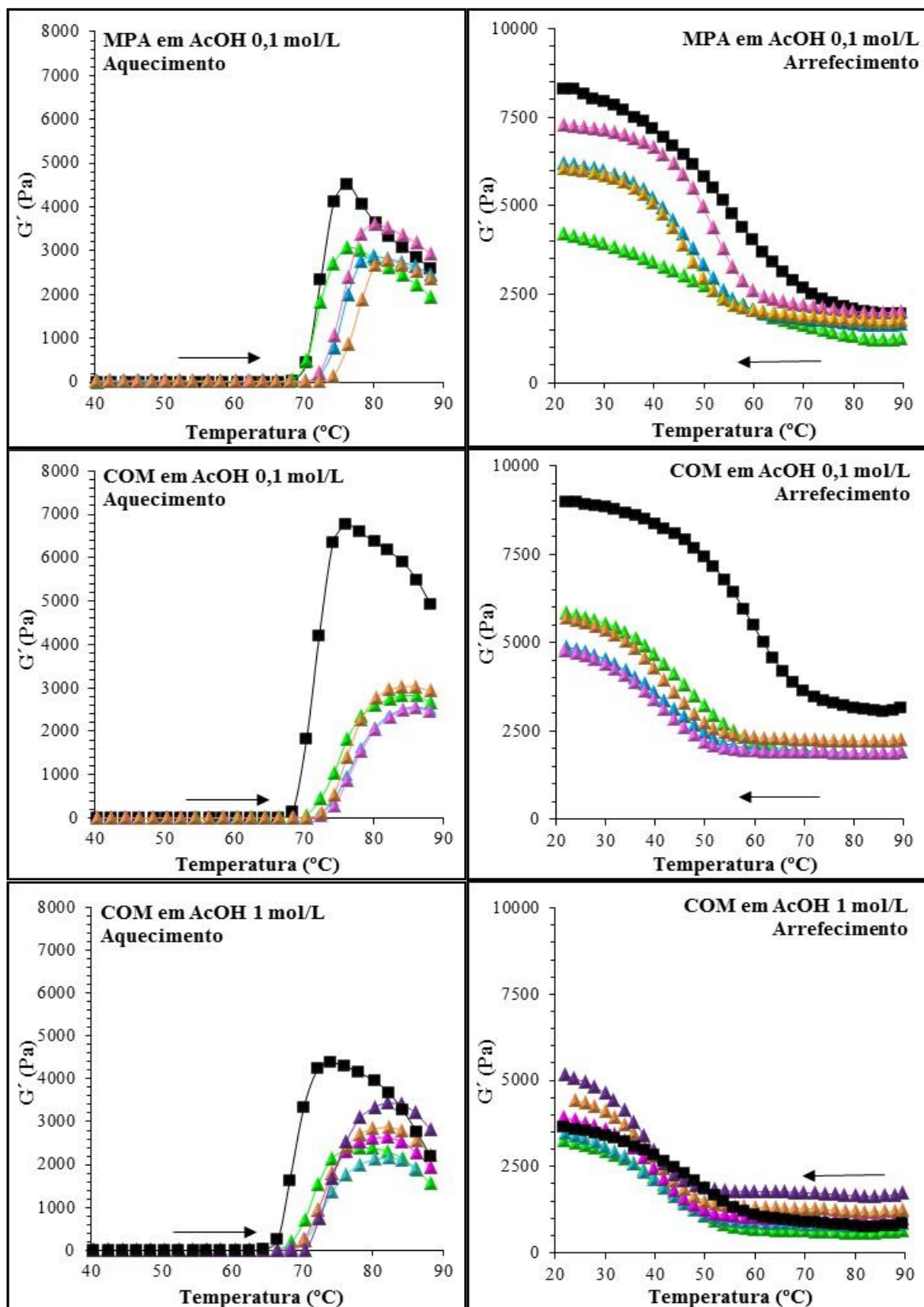
Para fins comparativos sobre as diferenças na viscoelasticidade dos géis a  $\tan \delta$  ( $= G''/G'$ ) foi medida em 1 rad/s e os valores obtidos foram: 0.0344 e 0.031 nos géis do amido MPA em H<sub>2</sub>O e em AcOH 0,1 mol/L, respetivamente e, 0.023, 0.020 e 0.054 nos géis do amido COM em H<sub>2</sub>O e AcOH a 0,1 e 1 mol/L, respetivamente. Em suma, estes resultados demonstram que o carácter elástico dos géis dos amidos gelatinizados em meio aquoso e com 0,1 mol/L de AcOH manteve-se inalterado enquanto o gel obtido na condição mais ácida (1 mol/L) teve um aumento no valor da  $\tan \delta$ , ou seja, em comparação com os outros géis, o carácter elástico diminuiu e a viscoelasticidade deste gel foi alterada.



**Figura 3.3:** Espectros mecânicos dos géis dos amidos MPA e COM a 20% (m/m). (20 °C, 1% de deformação). Símbolos fechados:  $G'$ , símbolos abertos:  $G''$ . (● ○) Água (pH  $\approx$  6.0), (■ □) AcOH 0,1 mol/L (pH  $\approx$  3.0), (▲ △) AcOH 1 mol/L (pH: 2.4).

### 3.3.2.1.2 Efeito da Adição da Quitosana Durante o Varrimento em Temperatura

A influência da adição da quitosana no comportamento reológico do amido foi analisada através da evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da variação da temperatura (Figura 3.4). Desta maneira foi acompanhado o processo de gelatinização (aquecimento de 40 a 90 °C) e a estruturação das pastas ou géis resultantes deste processo (arrefecimento de 90 a 20 °C). Com relação à adição da quitosana ao amido, de uma maneira geral, o perfil reológico do amido foi mantido. Esta é uma resposta que já era esperada visto que este é o biopolímero predominante em termos de concentração nos sistemas mistos e de capacidade gelificante.



**Figura 3.4:** Curvas médias da evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da temperatura. Efeito da adição da quitosana (Q) ao amido (MPA e COM) suspenso a 20% (m/m) em AcOH 0,1 e 1 mol/L. Frequência de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . (■) 0% Q, (▲) 0.1% Q, (▲) 0.3% Q, (▲) 0.5% Q, (▲) 1% Q, (▲) 2% Q.



Durante o aquecimento dos sistemas mistos, para ambos os amidos (MPA ou COM) e meios de solubilização utilizados (AcOH 0,1 e 1 mol/L), foram observadas alterações nos parâmetros reológicos devido à adição da quitosana, como por exemplo, na temperatura de início do processo de gelatinização (TG), no ponto máximo da curva ( $G'_{\text{máx}}$ ) e na temperatura de pico (TP) correspondente ao  $G'_{\text{máx}}$ . A Tabela 3.2 apresenta estes parâmetros obtidos com base na variação do módulo elástico ( $G'$ ) durante o aquecimento dos sistemas mistos.

**Tabela 3.2:** Parâmetros obtidos com base na variação do módulo elástico, durante o aquecimento, dos sistemas mistos de amido (MPA e COM) e quitosana (Q). Suspensões em ácido acético (0,1 e 1 mol/L).

	TG (°C)	TP (°C)	$G'_{\text{máx}}$ (kPa)
<b>MPA 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>64.0 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>76.3 ± 0.1<sup>a</sup></b>	<b>4.5 ± 0.6<sup>c</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.1% Q</b>	<b>66.2 ± 0.2<sup>b</sup></b>	<b>76.2 ± 0.0<sup>a</sup></b>	<b>3.1 ± 0.1<sup>a</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.3% Q</b>	<b>70.0 ± 0.1<sup>c</sup></b>	<b>80.1 ± 1.9<sup>b</sup></b>	<b>2.9 ± 0.4<sup>a</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.5% Q</b>	<b>70.0 ± 0.0<sup>c</sup></b>	<b>79.2 ± 1.0<sup>b</sup></b>	<b>3.7 ± 0.3<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 1% Q</b>	<b>72.2 ± 0.0<sup>d</sup></b>	<b>82.0 ± 0.0<sup>c</sup></b>	<b>2.8 ± 0.1<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>64.1 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>76.2 ± 0.1<sup>a</sup></b>	<b>6.8 ± 0.9<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>65.6 ± 1.0<sup>b</sup></b>	<b>85.0 ± 1.0<sup>bc</sup></b>	<b>2.8 ± 0.2<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>69.1 ± 0.8<sup>c</sup></b>	<b>86.0 ± 0.1<sup>c</sup></b>	<b>2.6 ± 0.1<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q</b>	<b>70.5 ± 0.1<sup>d</sup></b>	<b>86.1 ± 0.1<sup>c</sup></b>	<b>2.6 ± 0.3<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 1% Q</b>	<b>70.3 ± 0.1<sup>d</sup></b>	<b>84.7 ± 1.2<sup>b</sup></b>	<b>3.0 ± 0.2<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 1 mol/L)</b>	<b>61.4 ± 1.7<sup>a</sup></b>	<b>74.2 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>4.3 ± 0.4<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>64.4 ± 0.1<sup>b</sup></b>	<b>78.7 ± 1.2<sup>b</sup></b>	<b>2.4 ± 0.1<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>66.2 ± 0.2<sup>c</sup></b>	<b>82.1 ± 1.9<sup>c</sup></b>	<b>2.2 ± 0.4<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q*</b>	<b>66.4</b>	<b>82.0</b>	<b>2.6</b>
<b>COM 20% + 1% Q*</b>	<b>68.4</b>	<b>82.2</b>	<b>2.9</b>
<b>COM 20% + 2% Q*</b>	<b>70.6</b>	<b>82.0</b>	<b>3.4</b>

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão (exceto\*). Letras iguais na mesma coluna, para cada tipo de sistema, indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

TG: temperatura inicial do processo de gelatinização, TP: temperatura de pico,  $G'_{\text{máx}}$ :  $G'$  máximo.

Foi observado que a adição da quitosana ocasionou um aumento significativo na temperatura de início do processo de gelatinização dos amidos (TG). O aumento da TG ocorreu quer em relação aos controlos (amidos) quer com o aumento da concentração da quitosana nos sistemas mistos. A mesma tendência de resposta foi observada nos dois amidos (MPA e COM) e também nos meios de solubilização com AcOH nas duas

concentrações molares utilizadas (0,1 e 1 mol/L). Comparando-se a elevação da TG, em relação à suspensão de apenas amido, sem quitosana, observa-se que a adição da quitosana a 1% proporcionou um aumento considerável da temperatura entre 6 e 8 °C. A temperatura mais elevada para se atingir o momento crítico de aumento acentuado de  $G'$  devido à adição de quitosana, associado ao inchamento dos grânulos e interação entre eles, igualmente relacionado com o processo de gelatinização, pode ser atribuída a uma competição entre o amido e a quitosana pela água disponível no sistema. Num sistema composto somente por amido toda a água está livre para promover o inchamento dos grânulos, ao contrário do que ocorre num sistema misto de acordo com o que foi observado na presença dos dois biopolímeros.

Para além da competição entre os biopolímeros pela água presente no sistema, a quitosana quando solubilizada forma soluções viscosas que apresentam dependência da concentração do biopolímero (aumento da viscosidade com aumento da concentração), atribuída ao progressivo aumento de emaranhamentos entre as cadeias macromoleculares (Mucha, 1997; El-hefian *et al.*, 2010; El-hefian e Yahaya, 2010). Desta maneira, pode-se inferir também que este aumento da viscosidade conferido ao sistema misto pela quitosana também ajuda a aumentar a TG, visto que a mobilidade dos grânulos de amido diminui e consequentemente influencia no inchamento.

De acordo com o observado na Figura 3.4 e com os valores descritos na Tabela 3.2 a temperatura de pico (TP) aumentou nos sistemas mistos demonstrando que na presença da quitosana a rutura dos grânulos de amido inicia-se para temperaturas superiores. A restrição do inchamento granular devido à presença da quitosana, que foi demonstrada através do aumento da TG, também foi refletida na diminuição do  $G'_{\text{máx}}$  observada em todos os sistemas mistos em relação aos sistemas controlos. Isto demonstra que na presença da quitosana a interação grânulo-grânulo foi menor e o aumento do volume granular restringido. Para além, na presença de outros hidrocolóides a lixiviação dos componentes do amido para o meio aquoso pode ser dificultada devido ao aumento da viscosidade que o hidrocolóide proporciona (Funami *et al.*, 2005a; Mandala, 2012) e que, consequentemente, não favorece a difusão da amilose para o meio que é a fração de amido principalmente lixiviada nesta etapa do aquecimento. Assim, constatou-se que a formação

da rede tridimensional que é nesta fase desenvolvida foi alterada e o seu desenvolvimento foi restringido na presença da quitosana em comparação com os sistemas constituídos unicamente por amido (observado devido à diminuição do módulo elástico até alcançar o  $G'_{\text{máx}}$ ). De acordo com Mandala (2012) os sistemas de amido/hidrocolóides podem ser considerados como bifásicos quando os grânulos de amido estão inchados pelo facto de que o hidrocolóide está localizado na fase contínua (predominantemente constituída por amilose), o que poderá alterar a viscoelasticidade do sistema. Apesar destas observações supracitadas de que na presença da quitosana ocorreu um menor desenvolvimento da estrutura tridimensional, observa-se que entre os sistemas mistos o  $G'_{\text{máx}}$  tende a aumentar com o aumento da concentração da quitosana (observado mais claramente nos sistemas mistos em 1 mol/L de AcOH onde a quitosana é utilizada até 2%). Este efeito demonstra que a rede formada entre os componentes lixiviados dos grânulos e grânulos ainda inchados pode ser reforçada nesta etapa do aquecimento, o que poderá estar correlacionado com a viscosidade conferida pela quitosana interpenetrada na rede (porém, como mencionado, em relação a uma rede de amido a quitosana atua no sentido de restringir o desenvolvimento da estrutura durante o aquecimento pela restrição da lixiviação da amilose). Santos *et al.* (2002) obtiveram resultados comparáveis ao do presente trabalho quanto aos parâmetros reológicos obtidos durante o aquecimento em sistemas mistos de amidos de trigo e pentosanas. Os autores também utilizaram o amido a 20% e com a adição das pentosanas observaram aumento da TG (10 e 12 °C com 1% de pentosanas) e restrição do desenvolvimento da rede tridimensional ( $G'_{\text{máx}}$ ) em relação aos sistemas de amido (entretanto quanto maior a concentração de pentosanas menor foi o desenvolvimento de  $G'_{\text{máx}}$ ).

Após alcançar o  $G'_{\text{máx}}$  (fase na qual os grânulos apresentam o inchamento máximo e ocorre o início da rutura granular) a queda de  $G'$  com a elevação da temperatura está relacionada com a desintegração dos grânulos de amido e da estrutura anteriormente formada. A diminuição de  $G'$  foi observada quer nos sistemas constituídos unicamente pelos amidos quer nos sistemas mistos com a quitosana, porém, em diferentes extensões. Estas diferenças na queda de  $G'$  podem ser mensuradas através da quebra da estrutura total relativa (QETR), representada pela equação 3.2.

$$QETR = (G'_{\text{máx}} - G'_{90\text{ }^{\circ}\text{C}, 10\text{ min}}) / G'_{\text{máx}} \quad (\text{equação 3.2})$$

O  $G'_{90\text{ }^{\circ}\text{C}, 10\text{ min}}$  representa o valor de  $G'$  obtido após 10 min a 90 °C.

A Tabela 3.3 apresenta os valores da QETR para os sistemas controlos (amidos MPA e COM) e mistos com a quitosana nas duas concentrações de AcOH utilizadas (0,1 e 1 mol/L).

**Tabela 3.3:** Quebra da estrutura total relativa (QETR), durante o aquecimento, dos sistemas mistos de amido (MPA e COM) e quitosana (Q) em ácido acético 0,1 e 1 mol/L.

	<b>QETR (%)</b>
<b>MPA 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>56.7 ± 0.6<sup>c</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.1% Q</b>	<b>59.7 ± 0.5<sup>c</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.3% Q</b>	<b>41.3 ± 3.8<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.5% Q</b>	<b>44.0 ± 4.1<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 1% Q</b>	<b>36.3 ± 1.5<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>53.0 ± 3.7<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>31.9 ± 1.3<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>26.0 ± 2.4<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q</b>	<b>25.0 ± 0.6<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 1% Q</b>	<b>25.5 ± 1.3<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 1 mol/L)</b>	<b>80.8 ± 1.9<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>72.9 ± 3.9<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>60.2 ± 2.3<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q*</b>	<b>62.2</b>
<b>COM 20% + 1% Q*</b>	<b>56.6</b>
<b>COM 20% + 2% Q*</b>	<b>49.9</b>

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão (exceto\*). Letras iguais na mesma coluna, para cada tipo de sistema, indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

Os valores da QETR mostraram a mesma tendência para todos os sistemas mistos comparados com os controlos, ou seja, com a adição e com o aumento da concentração da quitosana os valores foram diminuindo, o que demonstra que a quitosana alterou a QETR com dependência da concentração (menor QETR quanto mais quitosana no sistema) resultando num menor enfraquecimento da estrutura em relação aos amidos isoladamente. Como a QETR está correlacionada quer com a destruição da rede tridimensional quer com a desintegração dos grânulos e, conseqüentemente, com a lixiviação dos componentes intragranulares para o meio, comparando-se os controlos os maiores valores obtidos em

AcOH a 1 mol/L permitem novamente inferir que neste meio ocorreu uma redução da massa molecular do amido facilitando a sua lixiviação e que a estrutura foi mais enfraquecida até os 90 °C. O mesmo é observado comparando os sistemas mistos do amido COM com a quitosana em AcOH a 0,1 e 1 mol/L (aumento da QETR no meio mais ácido). Entre os sistemas mistos na mesma concentração molar de ácido (0,1 mol/L), a QETR foi menor para os sistemas mistos com o amido COM do que para aqueles com o amido MPA (25.5 e 36.3% da QETR com 1% de quitosana, respetivamente). Em geral, estes resultados refletem que a presença da quitosana, nesta fase do processo, teve influência na quebra da estrutura dos sistemas de amido e podem ser correlacionados com uma menor desintegração granular, menor extensão da lixiviação da amilose e/ou da amilopectina e menor enfraquecimento da estrutura devido à quitosana no sistema.

Durante o arrefecimento, a reorganização molecular ou a recuperação da estrutura através de novas ligações de hidrogénio entre os componentes do amido (formação de rede tridimensional) será influenciada pela quantidade de amilose e de amilopectina lixiviadas para o meio (referido no capítulo 2, item 2.3.9.1) e também pela presença da quitosana. Um dos efeitos observados durante a diminuição da temperatura de 90 para 20 °C foi que a presença da quitosana ocasionou uma estruturação para temperaturas mais baixas do que a estruturação dos amidos gelatinizados sozinhos (em todos os sistemas mistos). Notou-se, por exemplo, que o início da estruturação para os controlos em AcOH 0,1 mol/L iniciou próximo aos 70 °C e com a quitosana esta estruturação tornou-se intensa em temperaturas menores (entre 55 e 60 °C). O perfil das curvas obtidas durante o arrefecimento (Figura 3.4) mostra que nos sistemas mistos gelatinizados em AcOH a 0,1 mol/L os valores de  $G'$  a 20 °C são mais baixos na presença da quitosana do que nos controlos (sistemas de amido). Entretanto, quando a gelatinização foi realizada em 1 mol/L de AcOH a adição de até 0.3% de quitosana resultou em valores de  $G'$  a 20 °C bastante similares ao do controlo e valores superiores nas concentrações mais elevadas demonstrando que neste meio e em maior concentração a quitosana contribuiu para o aumento do módulo elástico (ainda a 90 °C e a partir de 0.3% de quitosana o módulo elástico já é superior ao do controlo).

As diferenças entre a estruturação dos sistemas de amido e mistos com a quitosana (aumento de  $G'$  durante o arrefecimento) podem ser mensuradas através da

recuperação relativa da estrutura (RRE) definida através da equação 3.3.

$$RRE = (G'_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} - G'_{90\text{ }^{\circ}\text{C}, 10\text{ min}}) / G'_{90\text{ }^{\circ}\text{C}, 10\text{ min}} \quad (\text{equação 3.3})$$

O  $G'_{20\text{ }^{\circ}\text{C}}$  representa o valor de  $G'$  obtido a 20 °C após o arrefecimento e o  $G'_{90\text{ }^{\circ}\text{C}, 10\text{ min}}$  representa o valor de  $G'$  obtido após 10 min a 90 °C.

A Tabela 3.4 apresenta os valores da RRE para os sistemas controlos e mistos dos amidos MPA e COM a 0,1 mol/L de AcOH e do amido COM a 1 mol/L de AcOH gelatinizados com a quitosana nas diferentes concentrações adicionadas.

**Tabela 3.4:** Recuperação relativa da estrutura (RRE), durante o arrefecimento, dos sistemas mistos de amido (MPA e COM) e quitosana (Q) em ácido acético 0,1 e 1 mol/L.

	<b>RRE (%)</b>
<b>MPA 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>328 ± 34<sup>a</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.1% Q</b>	<b>241 ± 6<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.3% Q</b>	<b>270 ± 11<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.5% Q</b>	<b>260 ± 10<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 1% Q</b>	<b>243 ± 6<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>185 ± 4<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>204 ± 8<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>158 ± 13<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q</b>	<b>151 ± 0.4<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% + 1% Q</b>	<b>152 ± 8<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 1 mol/L)</b>	<b>335 ± 27<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>405 ± 61<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>302 ± 16<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q*</b>	<b>293</b>
<b>COM 20% + 1% Q*</b>	<b>257</b>
<b>COM 20% + 2% Q*</b>	<b>199</b>

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão (exceto\*). Letras iguais na mesma coluna, para cada tipo de sistema, indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

Através dos valores obtidos e descritos na Tabela 3.4 pode-se verificar que a recuperação relativa da estrutura durante o arrefecimento foi influenciada pela presença da quitosana. Em relação aos controlos os valores diminuíram para os sistemas mistos demonstrando que a RRE ocorreu em menor extensão comparada os amidos gelatinizados isoladamente. Quer a recuperação da estrutura (RRE) quer as diferenças nos valores finais

de  $G'$  a 20 °C nos sistemas com quitosana gelatinizados a 0,1 e 1 mol/L de AcOH demonstram a existência de uma correlação com os componentes intragranulares lixiviados dos amidos. Analisando-se os sistemas gelatinizados em 0,1 mol/L de AcOH foi observado que a quitosana diminuiu o inchamento dos grânulos (diminuiu  $G'_{\text{máx}}$ ) tendo assim diminuído a lixiviação da amilose em relação aos controlos (principal responsável pela formação da estrutura no arrefecimento) e a recuperação da estrutura (RRE) foi inferior (assim como os valores de  $G'$  a 20 °C).

Nos sistemas mistos gelatinizados em AcOH a 1 mol/L os valores da RRE também decrescem em relação ao controlo (principalmente nas concentrações mais elevadas). Entretanto, nestes sistemas este decréscimo pode ser atribuído aos valores de  $G'$  a 90 °C já serem superiores ao controlo a partir de 0.3% de quitosana e, consequentemente, os valores da RRE diminuíram. Também foi observado que, durante o aquecimento, entre os sistemas mistos com o amido COM nas duas concentrações de AcOH (0,1 e 1 mol/L) ao comparar o  $G'_{\text{máx}}$  (Tabela 3.2), por exemplo, a 1% de quitosana o valor alcançado pelo módulo foi mais aproximado do controlo no meio mais ácido (0,1 mol/L: diminuição de 3.8 kPa; 1 mol/L: diminuição de 1.4 kPa). Este resultado demonstra que com a diminuição da massa molecular do amido no meio mais ácido a lixiviação da amilose ocorreu em maior quantidade (mesmo com a presença da quitosana) em relação aos sistemas mistos gelatinizados em menor acidez aumentando a RRE (1%: 152 e 257% em AcOH 0,1 e 1 mol/L, respetivamente). A maior extensão de amilose no meio, para além da possível maior quantidade de cadeias lineares (visto que o ácido hidrolisa preferencialmente a parte amorfa do grânulo formada pela amilose e pelos pontos de ramificação da amilopectina) são fatores que podem ter proporcionado o auxílio na RRE que foi maior quer para o controlo (amido COM) quer para os sistemas mistos com a quitosana gelatinizados no meio mais ácido comparativamente com o meio menos ácido.

Nos sistemas mistos em 1 mol/L de AcOH, considerando que a lixiviação da amilose ainda é menor em comparação com o respetivo controlo e os valores de  $G'$  a 20 °C são semelhantes e superiores ao controlo nas maiores concentrações de quitosana, conclui-se que a quitosana, pelo menos nas concentrações mais elevadas, contribuiu para o desenvolvimento da rede formada durante o arrefecimento (aumento do módulo elástico

em relação ao controlo). Devido a estas observações (e às diferenças em relação à menor estruturação em AcOH a 0,1 mol/L) pode ser inferido que neste meio no qual as cadeias de amido possivelmente são menores e mais lineares a quitosana atuou de maneira diferenciada na estruturação, podendo ter ocorrido maior associação entre a amilose e a quitosana durante o arrefecimento como sugerido, por exemplo, por Chaisawang e Suphantharika (2005) que mencionam que o aumento de  $G'$  no arrefecimento está correlacionado, quer com a taxa de associação da amilose, quer com associações entre a amilose e o hidrocolóide. Também nos trabalhos de revisão de Mandala (2012) e BeMiller (2011) sobre sistemas de amido e outros hidrocolóides menciona-se que o aumento do módulo em sistemas mistos quando comparado unicamente ao amido pode ser associado como um indicador de formação de rede entre os hidrocolóides. No seguimento do presente trabalho, através do MID-IR verificou-se se os espectros demonstram ou não diferenças que possam indicar associações entre o amido e a quitosana ou se a rede de amido, neste caso, foi apenas reforçada pela quitosana (discutido no item 3.3.4).

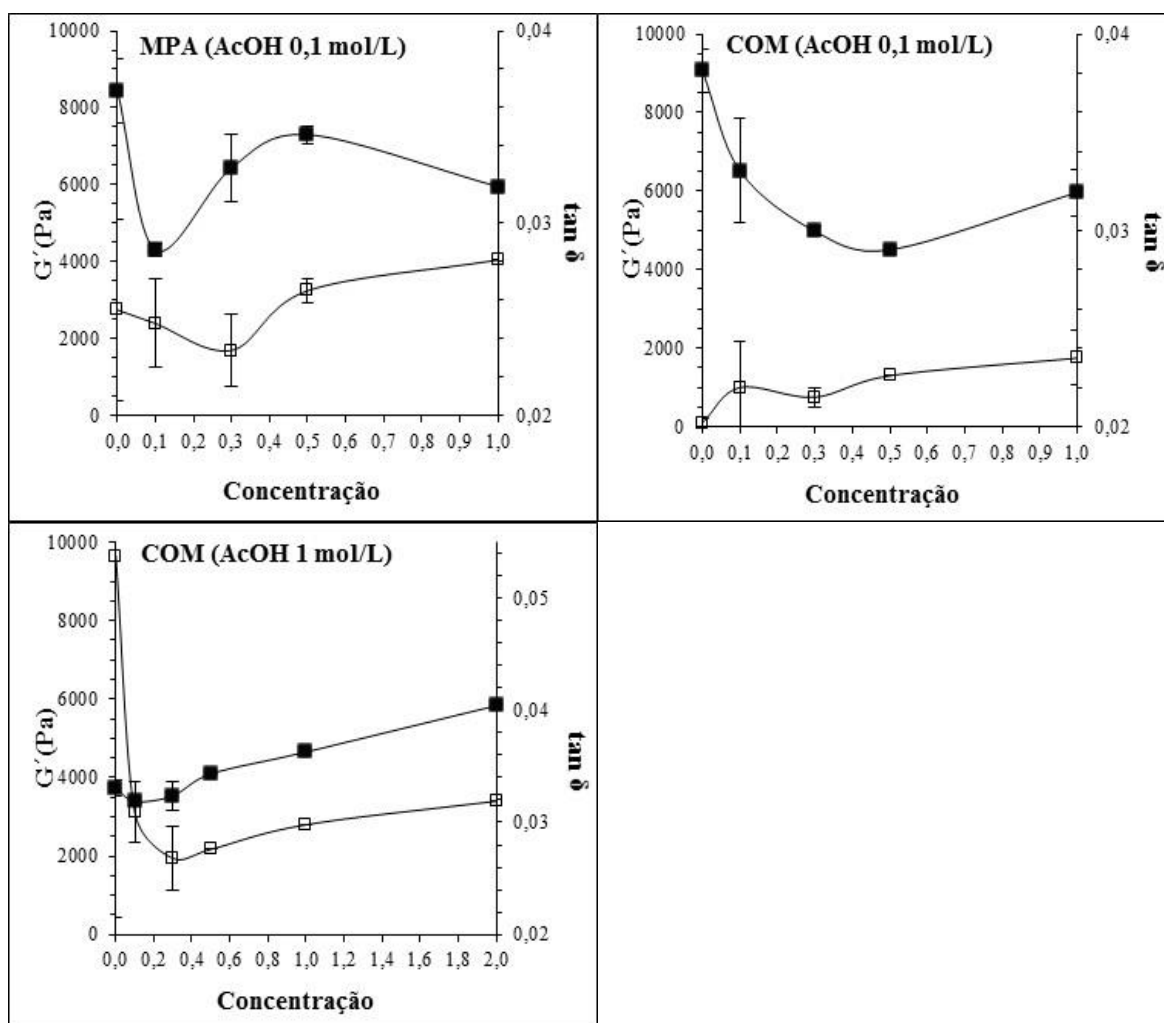
### **3.3.2.2 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos**

O comportamento viscoelástico dos sistemas mistos foi analisado após o término do varrimento em temperatura. Em todas as amostras (com ou sem adição da quitosana) o módulo elástico ( $G'$ ) foi significativamente superior ao módulo viscoso ( $G''$ ), em toda a gama de frequência utilizada nos ensaios, resultando em valores da  $\tan \delta$  ( $= G''/G'$ ) inferiores a 1.

Nos sistemas mistos (para ambos os amidos e concentrações molares de AcOH), o comportamento com relação à variação da frequência de oscilação foi semelhante ao comportamento dos controlos (amidos sem adição de quitosana). Este comportamento foi apresentado anteriormente na Figura 3.3 a qual demonstra que  $G'$  é essencialmente independente da frequência de oscilação e  $G''$  apresenta uma pequena elevação somente a partir de 1 rad/s (aumento dos processos dissipativos de energia e aumento do carácter viscoso traduzido no aumento da  $\tan \delta$  para frequências mais elevadas, observado em todas as amostras com ou sem quitosana).



Assim, os espectros mecânicos caracterizam a formação de géis bem estruturados, quer os géis de amido quer os géis mistos com a quitosana, com um comportamento sólido-elástico e nos quais as deformações são em grande parte recuperáveis. A Figura 3.5 apresenta a comparação do comportamento viscoelástico dos géis de amido e mistos com a quitosana, a 1 rad/s, através da qual pode-se observar a variação da  $\tan \delta$  e de  $G'$  em função da concentração de quitosana adicionada aos amidos.



**Figura 3.5:** Variação do módulo elástico ( $G'$ ) e da  $\tan \delta$  em função da concentração de quitosana, nos géis de amido a 20% (m/m) a frequência de 1 rad/s, após varrimento em temperatura. (20 °C, 1% de deformação). Símbolos fechados:  $G'$ . Símbolos abertos:  $\tan \delta$ .

Nesta figura a variação de  $G'$  é concordante com o observado no fim do varrimento em temperatura a 20 °C (diminuição do módulo em relação aos controlos com a

adição da quitosana no meio a 0,1 mol/L de AcOH e elevação a partir de 0.5% de quitosana no meio mais ácido). Refira-se também que apesar da diminuição de  $G'$  em relação ao controlo, para maiores concentrações de quitosana verifica-se um aumento deste módulo, ou seja, da rigidez do gel.

O comportamento viscoelástico dos géis, verificado pela variação quer de  $G'$  quer de  $G''$  é traduzido através da  $\tan \delta$ . Neste parâmetro observa-se que não houve diferença significativa entre os géis de amido e os géis mistos com a quitosana em AcOH a 0,1 mol/L ao passo que a 1 mol/L ocorreu um decréscimo na  $\tan \delta$  com a adição da quitosana (em relação ao gel de amido). Esta resposta demonstra que o carácter elástico dos géis de amido que foram gelatinizados na menor concentração do ácido acético não foi influenciado pela quitosana. Entretanto, na maior concentração molar do ácido a diminuição da  $\tan \delta$  observada nos géis de amido mistos com a quitosana reflete que o carácter elástico aumentou quando comparado com o controlo, ou seja, corresponde a formação de uma rede tridimensional mais forte (Chaisawang e Supphantharika, 2005). Assim, este aumento do carácter elástico pode ser correlacionado com o aumento da força destes géis mistos com a quitosana, apesar de esta característica estar mais associada ao valor absoluto de  $G'$  (o qual também foi observado em relação ao controlo). Em suma, no presente trabalho o varrimento em frequência de oscilação demonstrou através da  $\tan \delta$  que a quitosana contribuiu para aumentar o carácter elástico dos géis em meio ácido a 1 mol/L de concentração, não apresentando alteração significativa em relação aos controlos em 0,1 mol/L de AcOH.

No estudo de sistemas mistos, o termo sinergismo é bastante utilizado referindo-se geralmente ao aumento da viscosidade e/ou dos módulos dinâmicos (BeMiller, 2011). Neste sentido, pode-se dizer que no presente trabalho a quitosana proporcionou quer um efeito sinérgico quer não, dependendo do meio em que os sistemas mistos foram gelatinizados.

Na literatura, nos varrimentos em função da frequência de oscilação (análise mais comumente realizada), os resultados são bastante variados com relação à influência que a adição de hidrocolóides ao amido exerce sobre os módulos viscoelásticos e sobre as

alterações na viscoelasticidade final avaliada através da  $\tan \delta$ . Techawipharat *et al.* (2008) analisaram amido de arroz (normal e ceroso) misto com derivados de celulose e diferentes tipos de carrageninas. No amido normal a  $\kappa$ -carragenina proporcionou um significativo aumento de  $G'$  que foi atribuído à interação com a amilose na fase contínua (enquanto que os outros hidrocolóides, como por exemplo a carboximetilcelulose e metilcelulose, tiveram pouco efeito nos módulos). Entretanto todos os hidrocolóides aumentaram a  $\tan \delta$  em relação ao amido (gel melhor estruturado sem os hidrocolóides) e através deste parâmetro os autores concluíram que a amilose parece não interagir com os hidrocolóides havendo exclusão e separação de fases, observada por microscopia, sendo o sistema misto com a  $\kappa$ -carragenina um caso específico de interação. Nos sistemas mistos do amido ceroso a maioria dos hidrocolóides elevaram os módulos e não alteraram a  $\tan \delta$  em comparação com o controlo (semelhança na viscoelasticidade) apresentando microestruturas similares. A separação de fases em misturas de biopolímeros diferentes é comum de ocorrer devido à incompatibilidade termodinâmica (referenciado no capítulo 1, item 1.3) podendo alterar as propriedades viscoelásticas das pastas ou géis. No presente estudo não foi possível realizar uma análise microscópica através da qual se conseguisse observar como a quitosana e o amido se organizam no gel final. Entretanto, comparando os nossos resultados com os observados por Techawipharat *et al.* (2008) pode-se novamente inferir que o aumento do módulo elástico e a diminuição da  $\tan \delta$  com a adição da quitosana (em AcOH 1 mol/L) demonstram a formação de géis mais estruturados (maior caráter elástico) devido a uma possível maior associação da quitosana com a amilose neste meio (ocorrida durante o varrimento em temperatura). Quanto à microestrutura que realmente se forma serão necessárias futuras investigações, podendo-se sugerir microestruturas semelhantes entre o gel de amido e os géis mistos com a quitosana em AcOH a 0,1 mol/L e microestruturas diferenciadas entre o gel de amido e os géis mistos no meio mais ácido.

Santos *et al.* (2002) analisaram diferentes sistemas de amido de trigo com pentosanas e observaram efeito similar ao do presente trabalho quanto à diminuição do módulo elástico em relação ao controlo durante o arrefecimento (em AcOH 0,1 mol/L), porém efeito diferente quanto à viscoelasticidade destes géis. Nos sistemas mistos em que houve uma diminuição considerável no módulo elástico, em relação ao controlo, os géis obtidos apresentaram aumento mais pronunciado do caráter viscoso ( $\tan \delta$ ) e este resultado

foi atribuído ao impedimento da associação das cadeias de amilose devido à presença das pentosanas (formando uma rede de polímeros interpenetrantes e detrimento do caráter elástico do gel de amido). Chaisawang e Supphantharika (2005 e 2006) analisaram sistemas mistos de amido de mandioca catiónico (2005) e amido de mandioca nativo e aniónico (2006) com as gomas guar (neutra) e xantana (aniónica). Em ambos os trabalhos os módulos aumentaram em relação ao controlo e a  $\tan \delta$  diminuiu devido à formação de estruturas mais rígidas e com comportamento predominante de sólido. O sistema do amido catiónico com a xantana resultou no menor valor da  $\tan \delta$  (devido as interações entre as cargas opostas dos biopolímeros que aumentaram o  $G'$  no arrefecimento) seguido pelos sistemas com a guar e controlo, respetivamente. Nos sistemas do amido de mandioca nativo e aniónico com as gomas guar e xantana houve maior elevação dos módulos e menor  $\tan \delta$  com a xantana e os autores referem que, neste caso, a xantana reforçou mais a rede tridimensional em comparação com a guar (devido à estrutura mais rígida da xantana). Achayuthakan e Supphantharika (2008) analisaram sistemas mistos de amido de milho ceroso com as gomas guar e xantana. Ambas as gomas aumentaram os módulos em relação ao controlo (maior elevação com a xantana). Na análise da  $\tan \delta$  a goma guar pouco alterou a viscoelasticidade com uma pequena diminuição da  $\tan \delta$  em relação ao controlo (aumento do caráter elástico devido à redução das associações entre as cadeias de amilopectina). A  $\tan \delta$  com a xantana apresentou maior diminuição indicando a formação de pastas mais estruturadas que o controlo.

De acordo com as referências citadas, a diminuição da  $\tan \delta$  (aumento do caráter elástico dos géis) pode estar correlacionada quer com associações entre os diferentes biopolímeros quer com um reforço da rede tridimensional via aumento das interações entre as cadeias do polímero gelificante. Como anteriormente mencionado as análises de MID-IR deverão demonstrar qual o mecanismo que predominará no caso dos sistemas estudados neste trabalho.

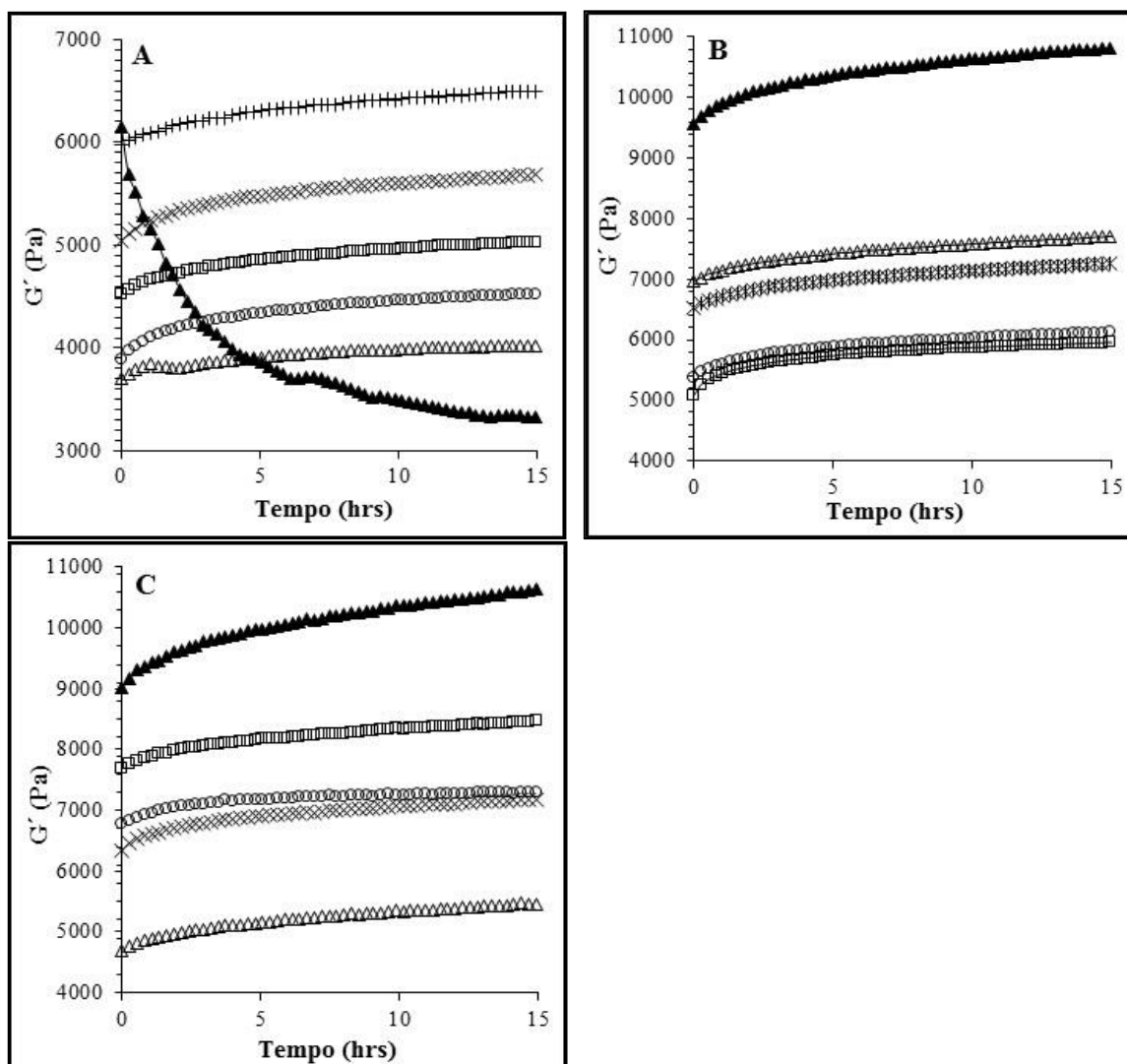
### **3.3.2.3 Varrimento em Tempo – Maturação**

A evolução das propriedades viscoelásticas dos géis mistos também foi analisada em função da maturação a 20 °C e comparada com a evolução dos controlos (géis de

amido).

Durante a maturação de géis de biopolímeros o comportamento que comumente é observado apresenta inicialmente uma elevação acentuada do módulo elástico ( $G'$ ) e na sequência uma variação contínua, porém menos intensa. Este comportamento corresponde à estruturação e reorganização da rede macromolecular. Na maturação de um gel, após a sua formação, a rede macromolecular é progressivamente reforçada devido à incorporação de uma quantidade maior de moléculas na fase gel e, assim, as propriedades elásticas aumentam, observando-se o aumento de  $G'$  (Lopes da Silva, *et al.*, 2004).

O comportamento anteriormente descrito foi observado através da evolução de  $G'$  (Figura 3.6). Nas primeiras horas de maturação houve um desenvolvimento maior dos módulos elásticos e após este período inicial o desenvolvimento permaneceu praticamente constante, porém continuou até o final das 15 horas de análise (ocorrência de rearranjos moleculares). Esta elevação do módulo elástico está relacionada com a estruturação dos géis devido à agregação das cadeias da amilose, processo rápido que ocorre em torno de 48 horas (Ahmad e Williams, 2001; Mandala, 2012), ao passo que a retrogradação da amilopectina é um processo mais lento mas que pode prosseguir durante várias semanas (Mandala, 2012). Assim, no período em que os géis em estudo foram analisados (15 horas) pode-se interpretar que a principal fração de amido envolvida é a amilose. Este comportamento (rápido aumento do módulo elástico e seguida atenuação) é reportado em trabalhos quer com géis de amido quer com géis de amido mistos com outros biopolímeros (Ahmad e Williams, 2001; Santos *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2008; Nagano *et al.*, 2008; Mandala, 2012).



**Figura 3.6:** Variação do módulo elástico ( $G'$ ) em função do tempo (maturação dos géis de amido a 20% de concentração (m/m)). A e C: Géis do amido COM (AcOH 1 e 0,1 mol/L, respetivamente). B: géis do amido MPA (AcOH 0,1 mol/L). (▲) 0% Q, (Δ) 0.1% Q, (○) 0.3% Q, (□) 0.5% Q, (x) 1% Q, (+) 2% Q.

Durante a maturação dos géis mistos a 20 °C a evolução observada é similar, exceto para o gel de amido gelatinizado no meio mais ácido (1 mol/L de AcOH). Neste gel foi observado um intenso decréscimo no módulo elástico desde o início do ensaio de maturação (Figura 3.6). Esta resposta demonstra que este gel foi perdendo a sua consistência ou firmeza.

Como forma de comparar as diferenças ocorridas no aumento do módulo elástico ( $G'$ ), definiu-se a estruturação relativa durante a maturação (ERM) de acordo com a

equação 3.4, a qual foi aplicada após o período de 5 horas (estruturação inicial) e após o período de 15 horas (período total da maturação avaliado).

$$\text{ERM} = (G'_{5 \text{ ou } 15h} - G'_{\text{inicial}}) / G'_{\text{inicial}} \quad (\text{equação 3.4})$$

O  $G'_{\text{inicial}}$  representa o valor de  $G'$  obtido no início da maturação e o  $G'_{5 \text{ ou } 15h}$  representa o valor de  $G'$  obtido após a maturação durante 5 e 15 horas, respetivamente.

A Tabela 3.5 apresenta os valores da ERM para os géis controlos (amidos MPA e COM) e para os géis mistos com a quitosana nas diferentes concentrações adicionadas.

**Tabela 3.5:** Estruturação relativa durante a maturação (ERM), após o período de 5 e 15 horas, dos géis mistos de amido (MPA e COM) e quitosana (Q) em ácido acético 0,1 e 1 mol/L.

ERM (%)		
	5 horas	15 horas
<b>MPA 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>10.9 ± 0.4<sup>c</sup></b>	<b>18.1 ± 1.1<sup>e</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.1% Q</b>	<b>10.8 ± 0.4<sup>c</sup></b>	<b>16.8 ± 0.1<sup>de</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.3% Q</b>	<b>6.2 ± 0.4<sup>a</sup></b>	<b>7.4 ± 2.6<sup>a</sup></b>
<b>MPA 20% + 0.5% Q</b>	<b>6.3 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>10.3 ± 0.0<sup>b</sup></b>
<b>MPA 20% + 1% Q</b>	<b>8.9 ± 1.9<sup>b</sup></b>	<b>13.4 ± 1.8<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 0,1 mol/L)</b>	<b>8.4 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>13.0 ± 0.0<sup>ab</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>6.5 ± 0.9<sup>a</sup></b>	<b>10.6 ± 0.9<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>9.3 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>13.7 ± 0.0<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q</b>	<b>12.8 ± 3.5<sup>b</sup></b>	<b>17.2 ± 3.3<sup>c</sup></b>
<b>COM 20% + 1% Q</b>	<b>7.2 ± 1.7<sup>a</sup></b>	<b>11.3 ± 1.9<sup>ab</sup></b>
<b>COM 20% (AcOH 1 mol/L)</b>	<b>-43.2 ± 6.1<sup>a</sup></b>	<b>-46.7 ± 0.8<sup>a</sup></b>
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>9.9 ± 1.0<sup>b</sup></b>	<b>14.4 ± 2.1<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>11.5 ± 0.5<sup>b</sup></b>	<b>16.3 ± 0.9<sup>b</sup></b>
<b>COM 20% + 0.5% Q*</b>	<b>7.4</b>	<b>11.3</b>
<b>COM 20% + 1% Q*</b>	<b>8.7</b>	<b>12.7</b>
<b>COM 20% + 2% Q*</b>	<b>5.5</b>	<b>9.0</b>

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão (exceto\*). Letras iguais na mesma coluna, para cada tipo de sistema, indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

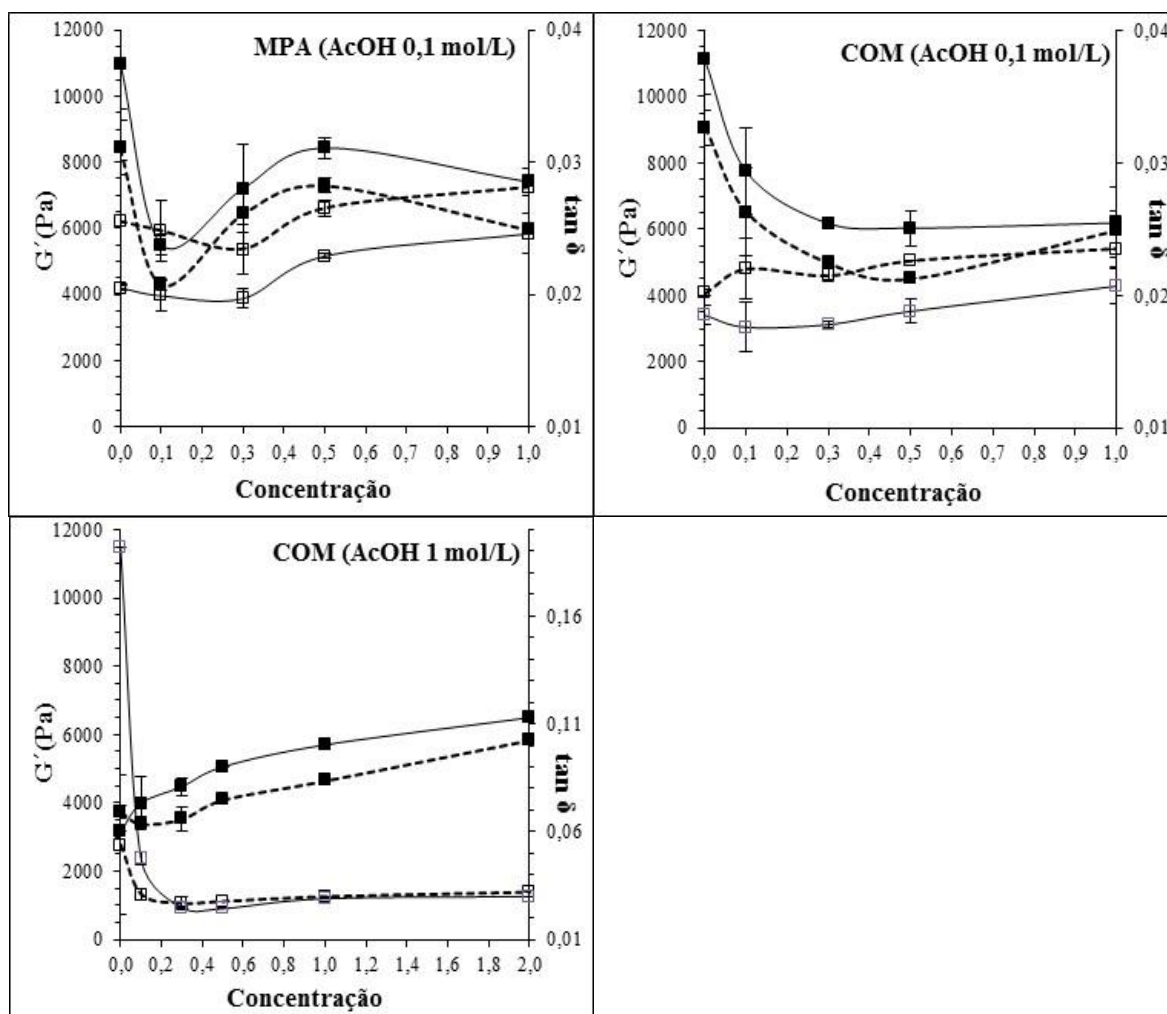
A comparação dos módulos elásticos nas horas iniciais da maturação dos géis (5 hrs) foi realizada para verificar se com a adição da quitosana os géis de amido desenvolveram em menor período de tempo (aceleração da gelificação). Comparando-se os géis mistos com os géis de amido (AcOH a 0,1 mol/L) observou-se que os valores decresceram significativamente com a adição da quitosana nos géis com o amido MPA e que o decréscimo dos valores nos géis mistos com o amido COM não foi significativo. No meio a 1 mol/L de AcOH os géis com a quitosana novamente demonstram a tendência ao decréscimo dos valores de ERM. Através destes resultados é possível concluir que a quitosana não acelerou o desenvolvimento dos géis nas horas iniciais dos ensaios. Ao final das 15 horas de maturação a diminuição dos valores de  $G'$  também foi observada na maioria dos géis mistos com o aumento da concentração da quitosana. Entretanto, como para os géis mistos com o amido COM em AcOH a 0,1 mol/L a diminuição dos valores da estruturação relativa não foi significativa e nem mesmo ocorreu para todas as misturas, o que é possível concluir é que, a quitosana não acelera a gelificação dos géis e, comparando-se com os géis unicamente compostos pelos amidos, pode ter o efeito de ocasionar menor reorganização molecular e diminuir a retrogradação a curto prazo. No varrimento em temperatura foi verificado que a quitosana diminuiu a lixiviação da amilose para o meio. Considerando a maior quantidade de amilose nos géis controlos faz sentido a resposta observada tendo-se em conta que as interações amilose-amilose estão diretamente relacionadas com a retrogradação a curto prazo avaliada nos ensaios de maturação. Assim, a menor retrogradação nos géis mistos com a quitosana pode ser atribuída a menor quantidade de amilose lixiviada do amido na presença da quitosana. Nos géis mistos no meio mais ácido, foi observada a mesma tendência de diminuição dos valores da ERM com o aumento da concentração da quitosana e, a incorporação da quitosana neste gel de amido demonstrou impedir a queda no módulo elástico ( $G'$ ). Neste caso, esta resposta pode ser interpretada como uma atuação da quitosana no sentido de manter a firmeza dos géis.

#### **3.3.2.4 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos**

Após os ensaios de maturação dos géis, realizados durante 15 horas, foram efetuados novos ensaios de varrimento em frequência de oscilação para verificar, através dos módulos viscoelásticos, de que maneira as características elásticas e viscosas dos géis



maturados alteraram-se após este período. Para tal, foi realizada uma comparação com o varrimento em frequência de oscilação anteriormente efetuado (após os ensaios em função da temperatura). A Figura 3.7 apresenta o comportamento viscoelástico dos géis de amido e mistos com a quitosana, a 1 rad/s, através da qual pode-se observar a variação da  $\tan \delta$  e de  $G'$  em função da concentração de quitosana adicionada aos amidos.



**Figura 3.7:** Variação do módulo elástico ( $G'$ ) e da  $\tan \delta$  em função da concentração de quitosana, nos géis de amido a 20% (m/m) a frequência de 1 rad/s (20 °C, 1% de deformação). Símbolos fechados:  $G'$ . Símbolos abertos:  $\tan \delta$ . Após varrimento em temperatura (- -). Após a maturação dos géis (—).

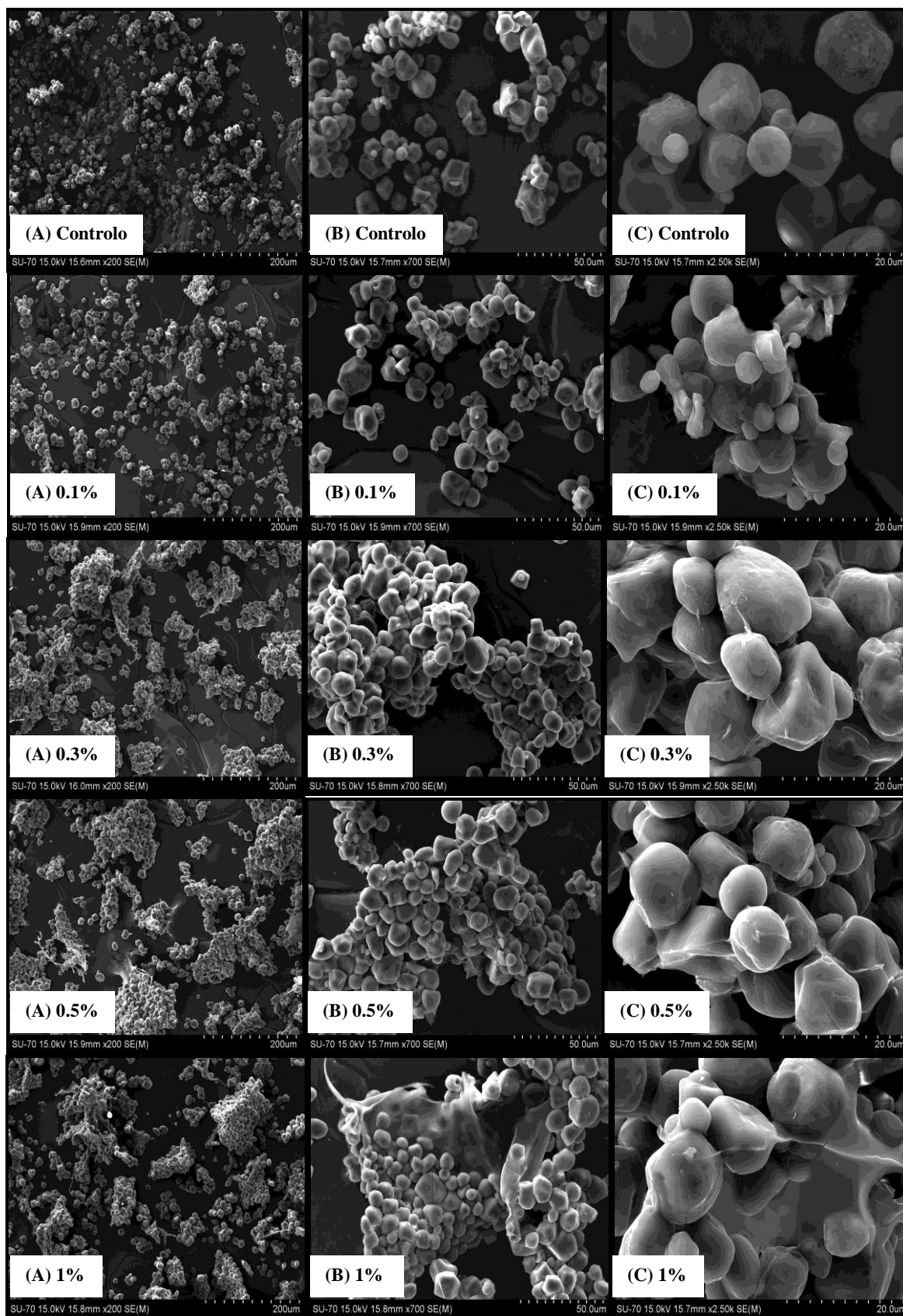
Comparando-se os módulos elásticos ( $G'$ ), antes a após a maturação dos géis, observa-se o mesmo perfil entre os dois varrimentos, com um aumento dos módulos elásticos após a maturação dos géis. Esta elevação está relacionada com a estruturação dos

géis observada durante a maturação, ou seja, com os rearranjos moleculares que ocorreram e que por conseguinte alteraram os valores do componente elástico entre os dois varrimentos em função da frequência de oscilação.

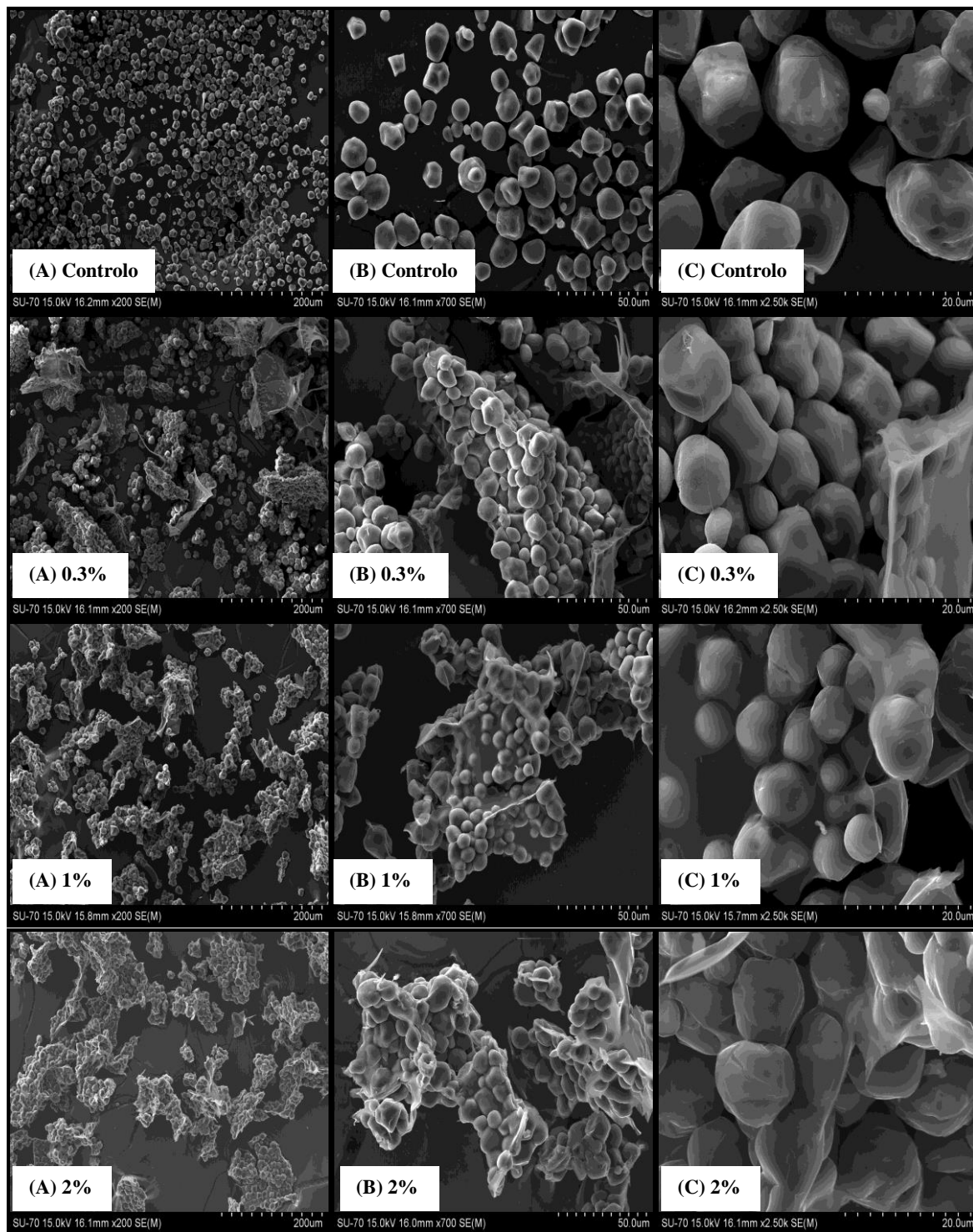
A  $\tan \delta$  ( $= G''/G'$ ) demonstra que a viscoelasticidade dos géis mistos não foi significativamente alterada após este período de 15 horas de maturação, observa-se apenas um pequeno aumento no carácter elástico (diminuição da  $\tan \delta$ ) após a maturação, como por exemplo, no gel do amido MPA com 1% de quitosana a  $\tan \delta$ , entre os dois varrimentos, passa de 0.028 para 0.025 após maturado. Como já poderia se esperar devido as observações durante a maturação dos géis, o gel de amido gelatinizado em AcOH a 1 mol/L apresentou elevação na  $\tan \delta$ , ou seja, o carácter viscoso deste gel foi acentuado após a maturação ( $\tan \delta$  alterou de 0.05 para 0.2 após maturação). Um pequeno aumento no carácter viscoso também foi observado com 0.1% de quitosana ( $\tan \delta$  alterou de 0.031 para 0.047 após maturação), enquanto nas maiores concentrações de quitosana a viscoelasticidade dos géis foi deveras semelhante entre os dois ensaios.

### **3.3.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)**

A microscopia eletrónica de varrimento (MEV) foi utilizada para observar os sistemas mistos antes do processo de gelatinização e a sua organização geral após liofilização das amostras previamente gelificadas “in situ” no reómetro. As figuras 3.8 e 3.9 apresentam os sistemas mistos antes do processo de gelatinização. Como não foram observadas diferenças entre os sistemas mistos preparados com os diferentes amidos (MPA e COM) são apresentadas as micrografias do MPA em AcOH 0,1 mol/L (Figura 3.8) e do COM em AcOH 1 mol/L (Figura 3.9).



**Figura 3.8:** Micrografias antes do processo de gelatinização do amido MPA e sistemas mistos com a quitosana (0.1, 0.3, 0.5 e 1%) em AcOH 0,1 mol/L. (A) 200, (B) 700 e (C) 2500 X.



**Figura 3.9:** Micrografias antes do processo de gelatinização do amido COM e sistemas mistos com a quitosana (0.3, 1 e 2%) em AcOH 1 mol/L. (A) 200, (B) 700 e (C) 2500 X.

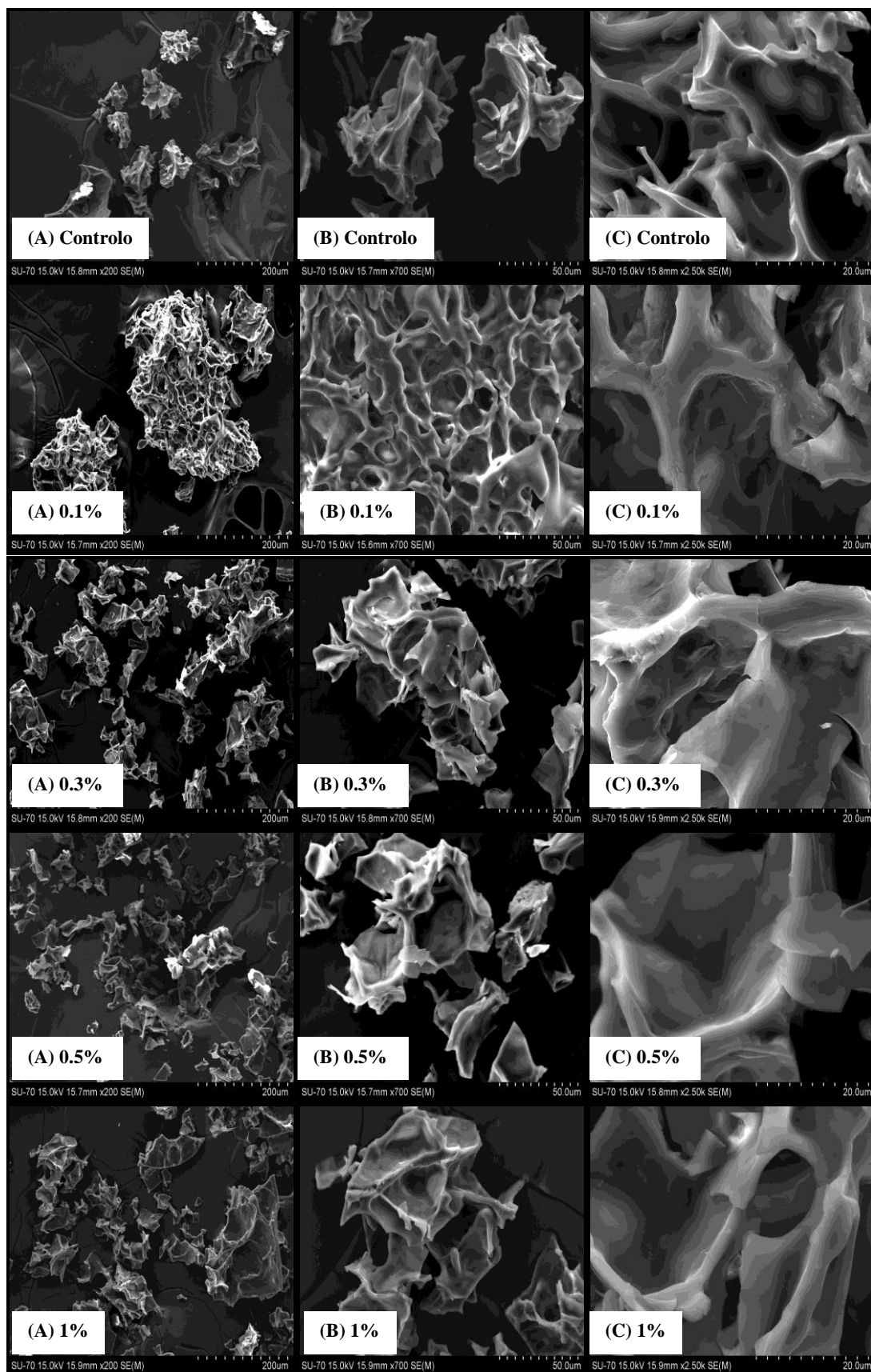
Nos sistemas mistos a presença da quitosana é bastante perceptível. Desde o sistema misto com a adição de 0.1% de quitosana já se observa a sua presença que deixa os grânulos de amido mais unidos. Na medida em que se aumenta a concentração da quitosana os grânulos de amido vão ficando mais retidos ou englobados pelo biopolímero que, devido ao processo de liofilização, é visualizado quer como se fosse um filme sobre os grânulos de amido quer formando uma camada mais espessa. As microestruturas observadas estão concordantes com o que foi observado nas temperaturas de início do processo de gelatinização. Aumentando-se a concentração de um segundo biopolímero em um sistema de amido (no caso a quitosana) os grânulos já não poderão inchar livremente resultando na elevação da TG.

Chaisawang e Supphantharika (2005) compararam a micrografia do amido catiónico de tapioca com sistemas mistos na presença de goma guar (neutra) e xantana (aniónica) submetidos à temperatura de 64 °C. Na presença das gomas observaram os grânulos de amido envoltos pelas mesmas, sendo que a goma xantana parece ter agregado mais grânulos (amido e goma com cargas opostas) em comparação com a guar e resultaram em maior e menor temperatura de gelatinização (58.3 e 55.8 °C respectivamente). Em 2006 os mesmos autores compararam amido de tapioca nativo e aniónico com as gomas guar e xantana em sistemas mistos submetidos à temperatura de 68 °C. Neste trabalho os autores descrevem que a goma guar não envolveu nem o amido nativo nem o aniónico, formando uma estrutura “em folha” que permitiu o inchamento mais livre dos grânulos de amido. Com a goma xantana foram observados diferentes envoltimentos entre o amido nativo e o aniónico. No caso do amido nativo a maioria dos grânulos foi completamente envolvida pela xantana (melhor aderência) enquanto no amido aniónico a goma xantana não envolveu os grânulos da mesma maneira sugerindo que a incompatibilidade das cargas negativas dos biopolímeros tenha sido a causa.

Cai *et al.* (2011) realizaram um interessante trabalho, utilizando a MEV, que demonstra bem a restrição do inchamento granular do amido e o aumento da temperatura de gelatinização devido à presença de outro biopolímero. Os autores analisaram sistemas mistos de amido de batata e goma xantana submetidos a variadas temperaturas (50, 60, 65, 70, 80 e 95 °C) e ao processo de liofilização. De acordo com os autores foram possíveis as

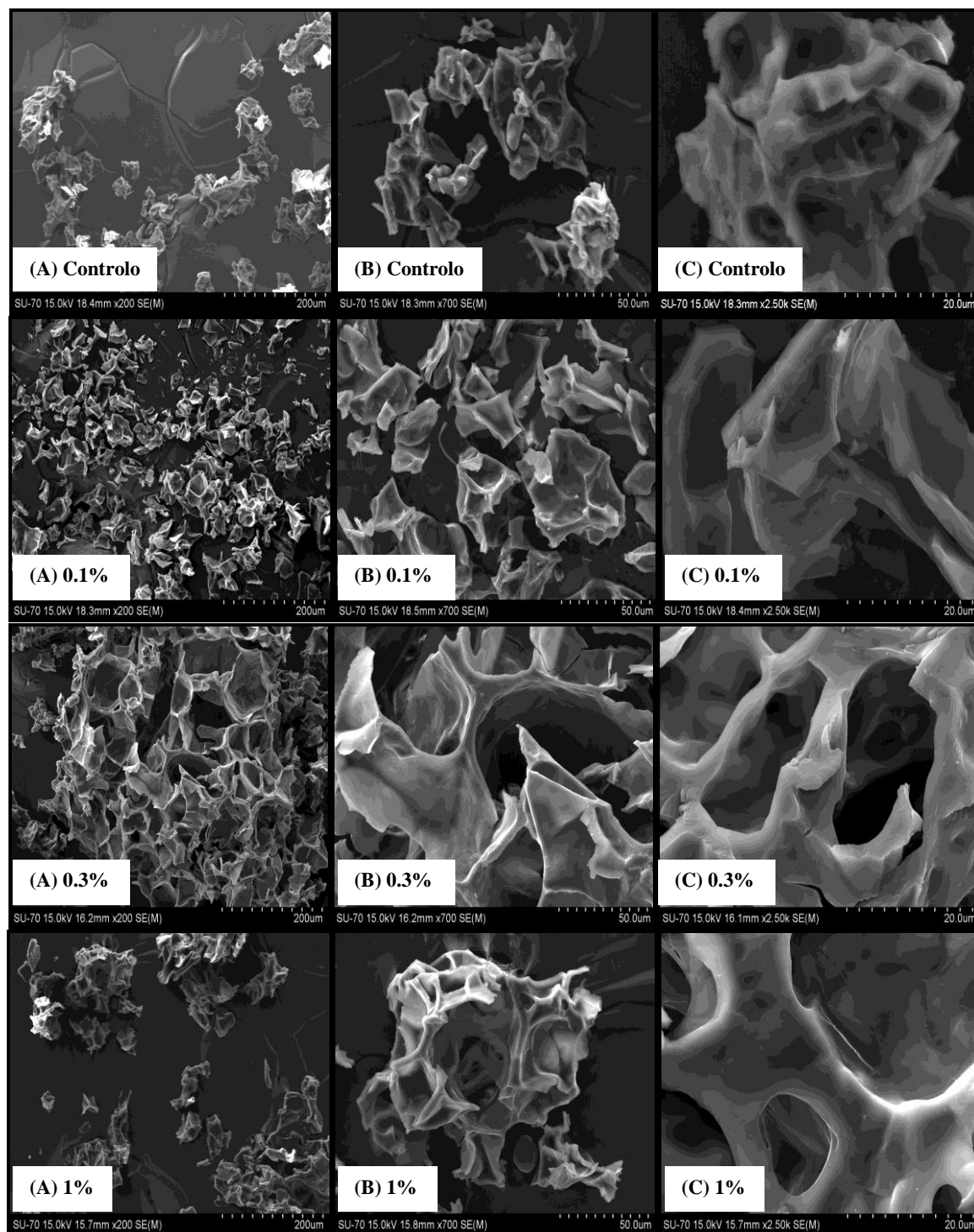
seguintes observações comparando-se os sistemas mistos com os sistemas sem a presença da goma: A 50 °C os grânulos de amido estavam envolvidos pela goma xantana e apresentaram tamanho menor do que no controle demonstrando a restrição do inchamento granular na presença da goma. A 60 °C no controle a maioria dos grânulos já perderam a estrutura granular e no sistema misto houve apenas o inchamento. A 65 °C o controle demonstrou a quase destruição completa da estrutura granular do amido (estrutura gelatinizada em forma de “folha”) ao passo que no sistema misto os grânulos estavam no inchamento máximo com a xantana em sua superfície. Isto demonstrou que a goma inibiu a destruição granular do amido e a lixiviação da amilose e consequentemente na presença da goma o amido gelatinizou em temperaturas superiores. A 70 °C o controle demonstrou estrutura gelatinizada em forma de “folha” e no sistema misto (ainda com alguns grânulos inteiros) iniciou a formação de uma estrutura única entre os biopolímeros. A 80 °C o controle apresentou uma estrutura com grandes aberturas e não bem distribuídas (identificadas por alguns pesquisadores como parecendo um favo de mel) enquanto no sistema misto as aberturas foram maiores e com melhor distribuição. Enfim a 95 °C quer o controle quer o sistema misto apresentaram esta estrutura em favos, no entanto, de acordo com os autores, o sistema misto apresentou estrutura mais espessa.

No presente trabalho as micrografias foram adquiridas após os sistemas serem gelificados a 90 °C (Figuras 3.10, 3.11 e 3.12) e na estrutura geral, quer dos controles quer dos sistemas mistos após o processo de gelatinização, não se observou mais a presença dos grânulos de amido e sim a formação de uma estrutura única que apresenta uma aparência enredada ou, pode-se dizer, com a presença de cavidades. Com a adição da quitosana observa-se que estas cavidades aumentaram de tamanho. Pôde-se observar também que as estruturas resultantes da gelificação AcOH a 1 mol/L eram mais quebradiças e com as paredes das cavidades mais finas.



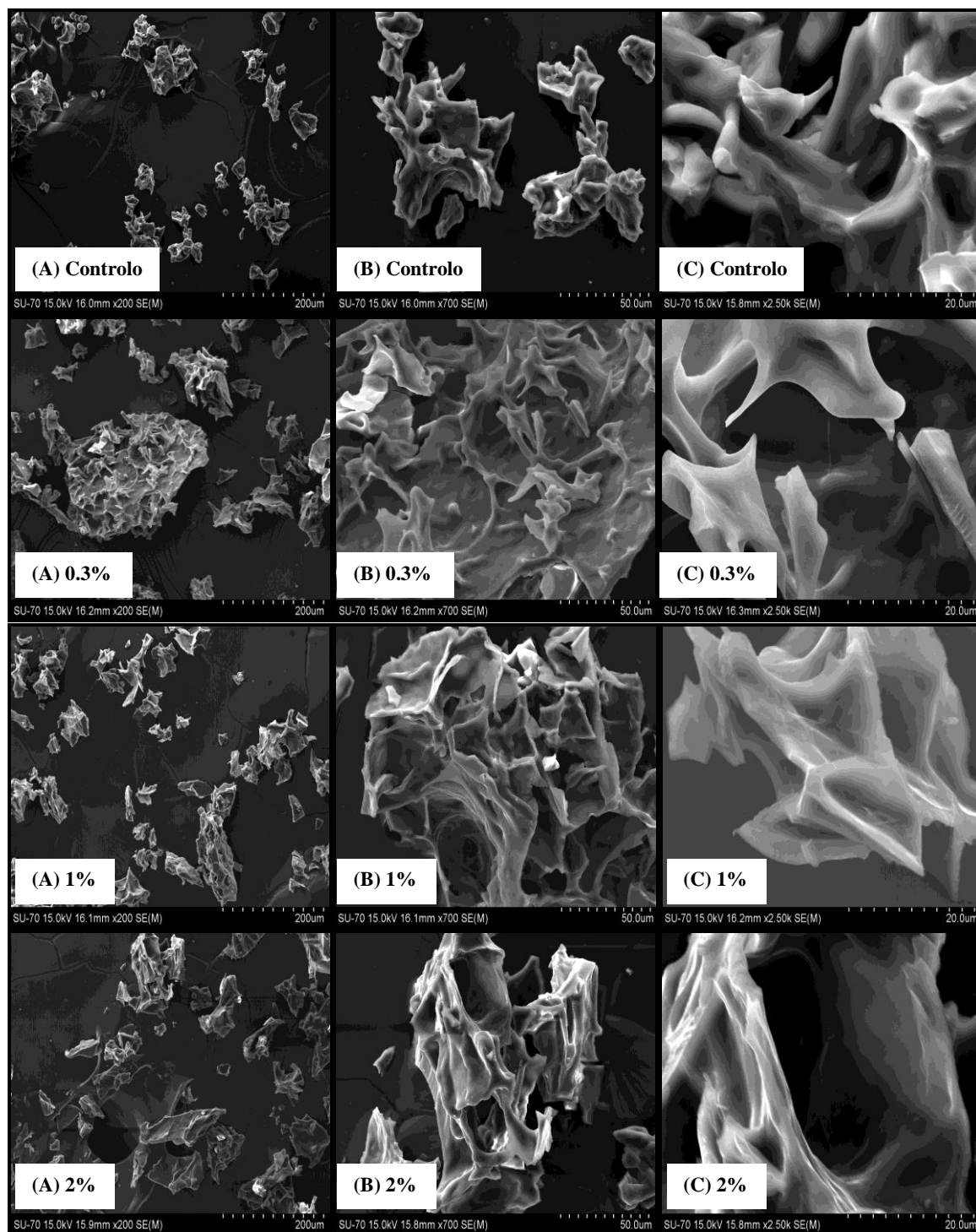
**Figura 3.10:** Micrografias da estrutura do amido MPA e dos sistemas mistos com a quitosana (0,1, 0,3, 0,5 e 1%) gelificados em AcOH 0,1 mol/L. (A) 200, (B) 700 e (C) 2500 X.





**Figura 3.11:** Micrografias da estrutura do amido COM e dos sistemas mistos com a quitosana (0.1, 0.3 e 1%) gelificados em AcOH 0,1 mol/L. (A) 200, (B) 700 e (C) 2500 X.





**Figura 3.12:** Micrografias da estrutura do amido COM e dos sistemas mistos com a quitosana (0.3, 1 e 2%) gelificados em AcOH 1 mol/L. (A) 200, (B) 700 e (C) 2500 X.

### **3.3.4 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)**

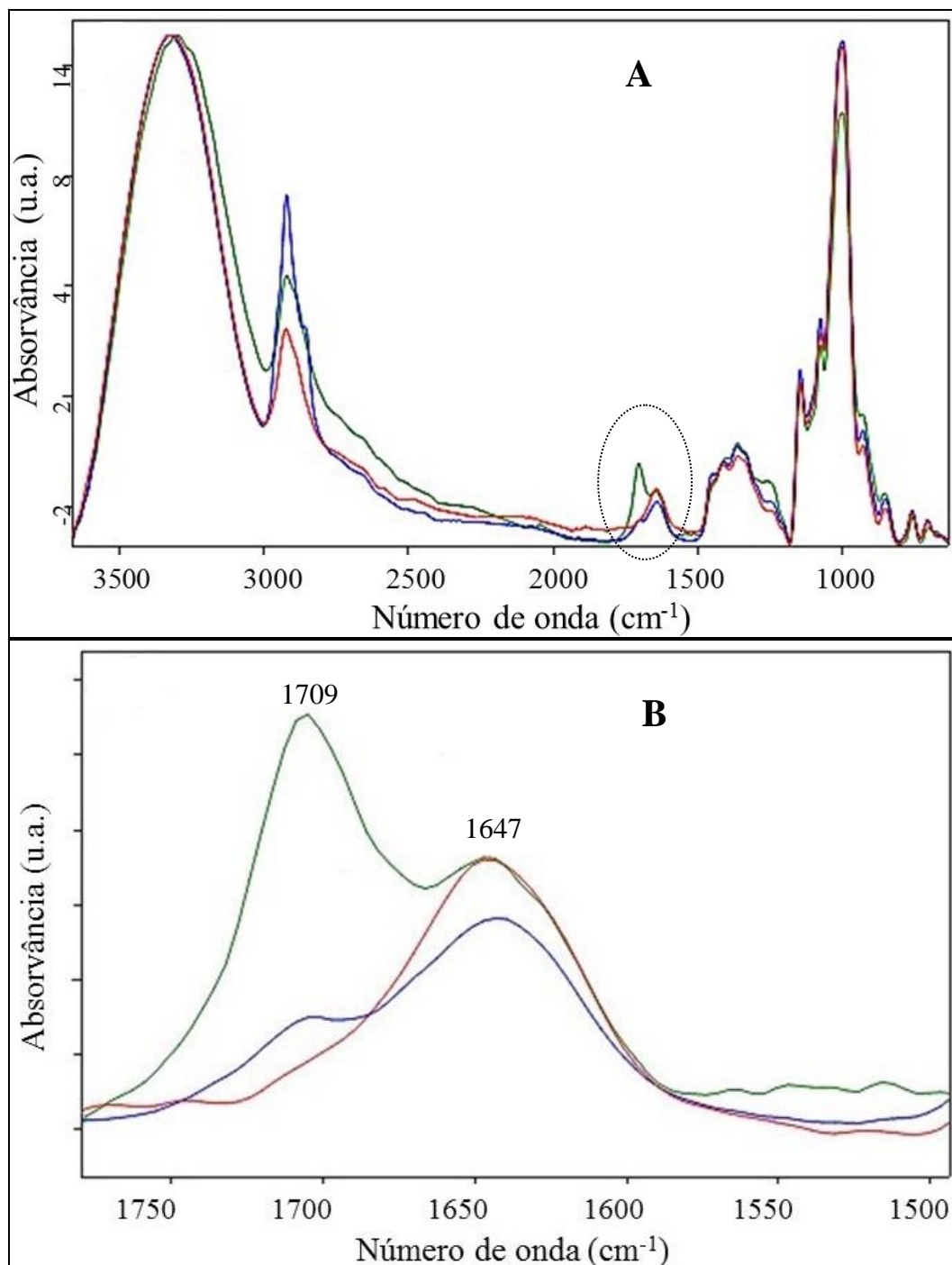
O MID-IR foi utilizado para verificar a ocorrência de possíveis alterações nos espectros como indicação de interações entre os biopolímeros. O perfil espectral do amido e suas bandas características foram apresentadas no capítulo 2 item 3.8 e o da quitosana no item 3.1 do presente capítulo (Figura 3.1).

É possível a ocorrência de ligações intermoleculares entre o amido e a quitosana, através da formação de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilos do amido e os grupos hidroxilos e/ou amino da quitosana. Estudos realizados em filmes de amido e quitosana têm descrito alterações na posição de determinadas bandas espectrais, nomeadamente do grupo amino e sugerido à interação entre estes biopolímeros. Pequenos deslocamentos no número de onda como, por exemplo, na ordem de  $2\text{ cm}^{-1}$  são suficientes para serem associados à ocorrência de interações (Liu *et al.*, 2013). As regiões espectrais nas quais as interações entre a quitosana e o amido têm sido visualizadas são: entre  $3600$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  (Lin *et al.*, 2010; Nanaki *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013), entre  $1700$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  (Xu *et al.*, 2005; Bourtoom e Chinnan, 2008; Lin *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Nanaki *et al.*, 2012) e também na região da impressão digital dos biopolímeros (Arockianathan *et al.*, 2012). Na sequência são apresentadas as observações realizadas no presente trabalho.

#### **3.3.4.1 Modificações Ocasionadas pelo Ácido na Gelatinização do Amido**

Primeiramente foi observado que o ácido acético forma complexos com o amido, verificado nos espectros dos amidos gelatinizados em ácido acético nas duas concentrações utilizadas (Figura 3.13. (A)). Na Figura 3.13 (B) onde apresenta-se a ampliação entre  $1800$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  observa-se que o espectro do amido gelatinizado em água apresenta um pico a  $1647\text{ cm}^{-1}$  que correspondente à água remanescente no amido. No caso dos amidos gelatinizados em ácido aparece também uma banda a  $1709\text{ cm}^{-1}$  correspondente à presença do grupo carboxílico, sendo evidente que é originado pelo ácido acético, o qual deve ter formado complexos de inclusão com o amido evitando assim a sua volatilização durante o aquecimento e a liofilização. O pico é mais alto no caso do ácido mais concentrado. Outros

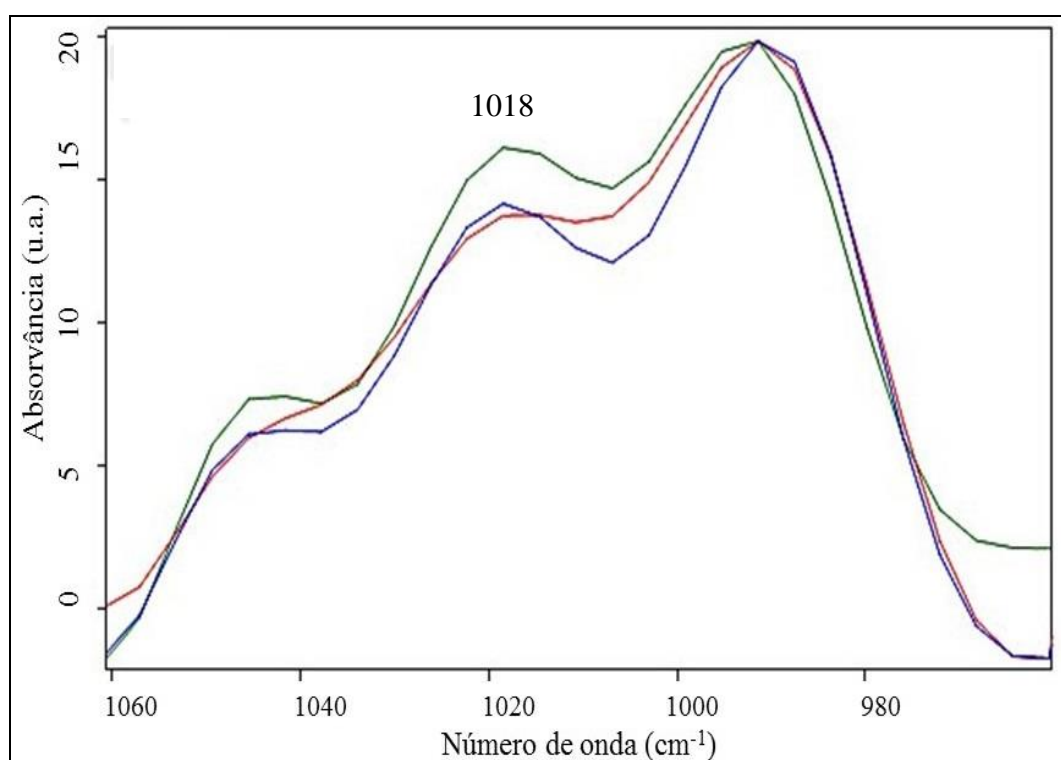
trabalhos também identificaram o grupo carbonilo de ácidos próximos a este número de onda do IR (Ritthidej *et al.*, 2002; Mathew e Abraham, 2008; Zhong *et al.*, 2011).



**Figura 3.13:** (A) Média dos espectros de MID-IR do amido COM após a gelatinização em meio aquoso e em meio acidificado (AcOH 0,1 e 1 mol/L) (4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , OPUS 5.0®). (B) Ampliação da zona entre 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

—  $\text{H}_2\text{O}$  — AcOH 0,1 mol/L — AcOH 1 mol/L

Quanto às outras zonas do espectro pode-se observar que existe uma variação nas bandas dos grupos C-H com relação à intensidade de absorvância entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3.13. (A)). No caso do amido gelatinizado na presença do ácido acético a intensidade é maior do que no amido gelatinizado em água. Este aumento de intensidade pode ser interpretado como uma maior liberdade nas vibrações das ligações C-H. Na zona dos 1000  $\text{cm}^{-1}$  não acontecem grandes modificações, a não ser que o pico do amido gelatinizado em ácido acético 1 mol/L é mais baixo do que nos outros casos (Figura 3.13. (A)) e, ao fazer a segunda derivada dos espectros para evidenciar a localização dos picos, nota-se um pequeno incremento a 1018  $\text{cm}^{-1}$  (referente a parte amorfa do grânulo) (Figura 3.14). Estes factos poderiam estar a indicar alguma extensão de hidrólise no amido em ácido acético a 1 mol/L e/ou diminuição das pontes de hidrogénio entre as moléculas de amido.

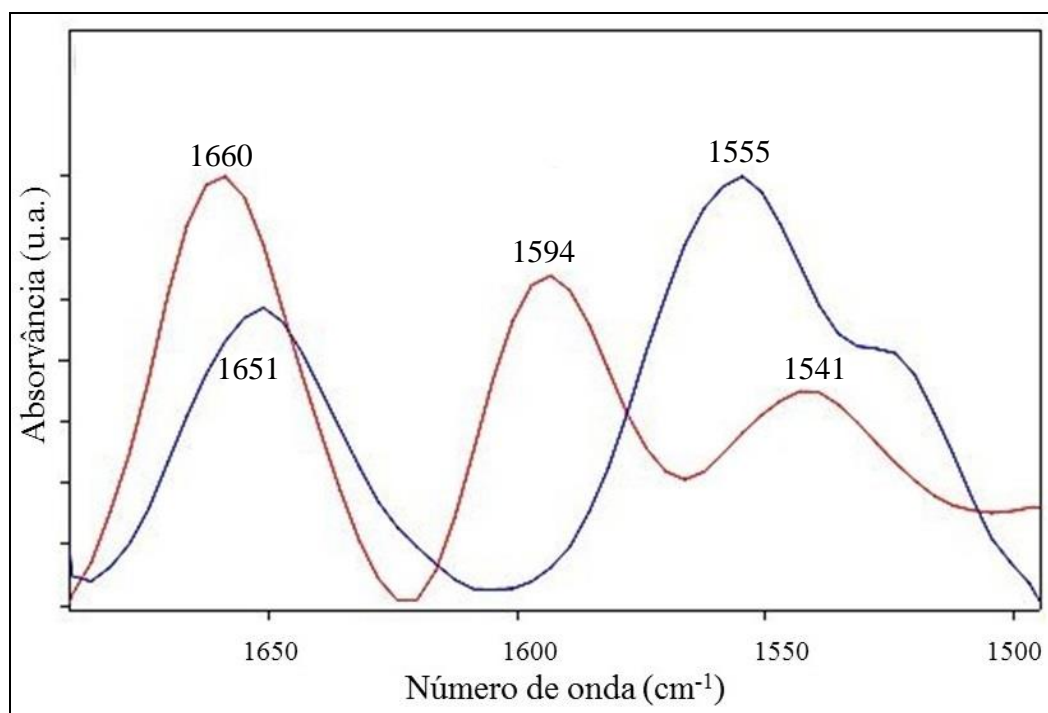


**Figura 3.14:** Segunda derivada dos espectros de MID-IR do amido COM após a gelatinização em meio aquoso e em meio acidificado (AcOH 0,1 e 1 mol/L) na zona de 1000  $\text{cm}^{-1}$ , OPUS 5.0®).

— H<sub>2</sub>O      — AcOH 0,1 mol/L      — AcOH 1 mol/L

### 3.3.4.2 Modificações Ocasionadas pelo Ácido na Quitosana

Foi observado que a adição do ácido acético à quitosana ocasionou modificações no espectro. Como pode ser visto na Figura 3.15, as bandas a 1660 e 1594  $\text{cm}^{-1}$  presentes na quitosana pura, alteram a posição espectral para 1651 e 1555  $\text{cm}^{-1}$ . Esta alteração está a indicar a formação de acetato de quitosana reportada por Osman e Arof (2002).



**Figura 3.15:** Segunda derivada dos espectros de MID-IR da quitosana na zona entre 1700 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ . (OPUS 5.0®).

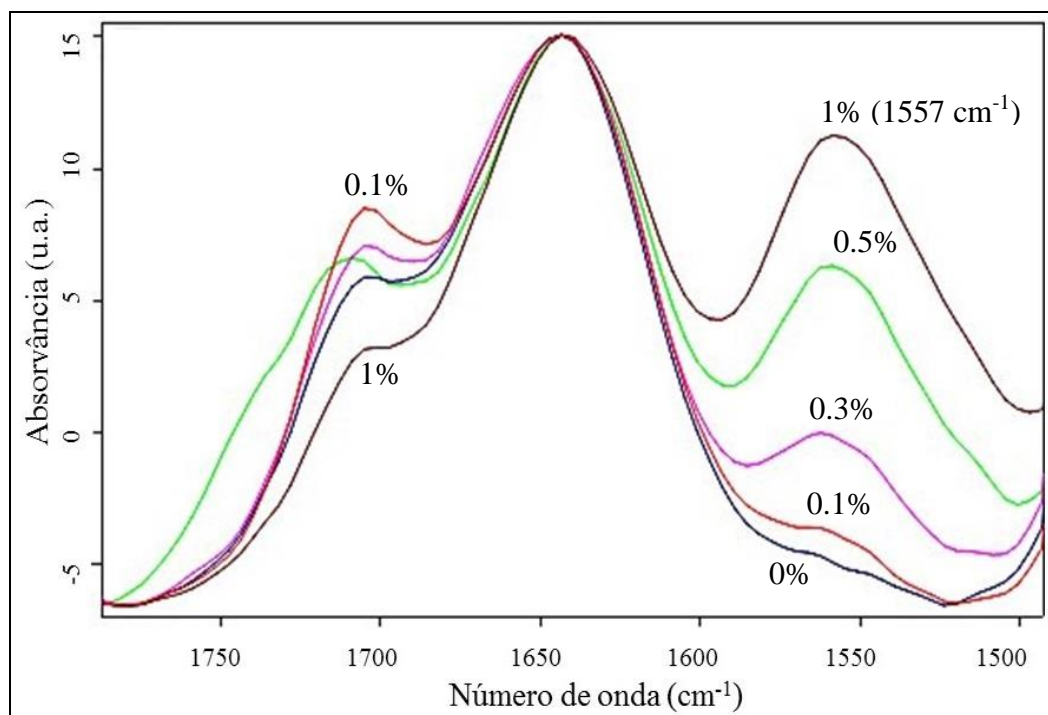
— Quitosana em pó      — Quitosana dissolvida em AcOH 0,1 mol/L e liofilizada

A banda do grupo carbonilo  $\text{C}=\text{O}-\text{NHR}$  é observada a 1660  $\text{cm}^{-1}$  e a da amina a 1594  $\text{cm}^{-1}$ . Uma banda referente ao  $\text{NH}_3^+$  deveria aparecer como um pequeno ombro próximo a 1514  $\text{cm}^{-1}$  (Osman e Arof, 2002). A sua ausência no espectro da quitosana dissolvida em ácido acético pode estar a indicar uma interação entre o  $\text{NH}_3^+$  da quitosana e o  $\text{COO}^-$  do acetato do ácido acético. A banda do grupo carbonilo deslocou-se para 1651  $\text{cm}^{-1}$  no sistema quitosana-ácido acético e a banda amina para 1555  $\text{cm}^{-1}$ . Assim, este deslocamento nestas bandas indica uma possível interação ocorrida entre o ácido acético e os dadores azotados da quitosana (Osman e Arof, 2002). Isto pode significar que a

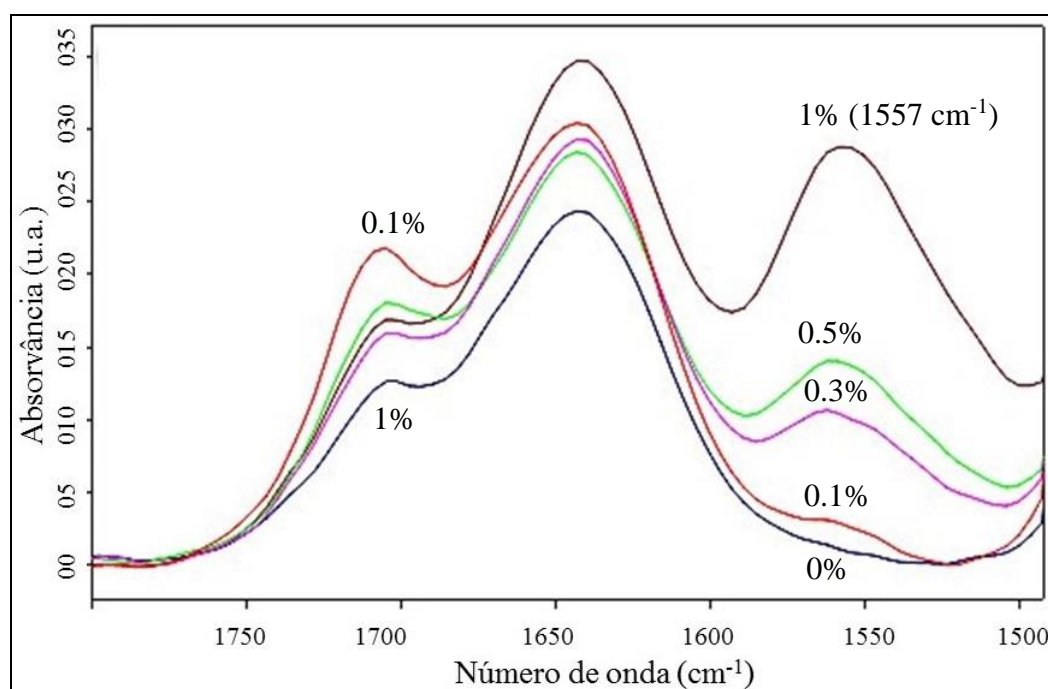
quitosana dissolvida em ácido acético não participa no sistema como uma molécula carregada positivamente, tendo os seus grupos  $\text{NH}_3^+$  reagido com o ácido acético desprotonado para formar o acetato de quitosana.

### 3.3.4.3 Sistemas Mistos de Amido e Quitosana

Nos meios acidificados com  $\text{AcOH}$  a 0,1 mol/L, quer para os sistemas mistos com o amido COM quer para os sistemas mistos com o amido MPA, pode-se observar a banda da amina que aumenta com o aumento da quantidade de quitosana no sistema misto. Nos sistemas formulados com 0.1% de quitosana esta banda foi observada na posição espectral de  $1560\text{ cm}^{-1}$  alterando-se para  $1557\text{ cm}^{-1}$  com 1% deste polímero (Figuras 3.16 e 3.17). Este deslocamento no número de onda em função da adição da quitosana pode ser interpretado como uma indicação de alguma interação entre o amido e a quitosana.



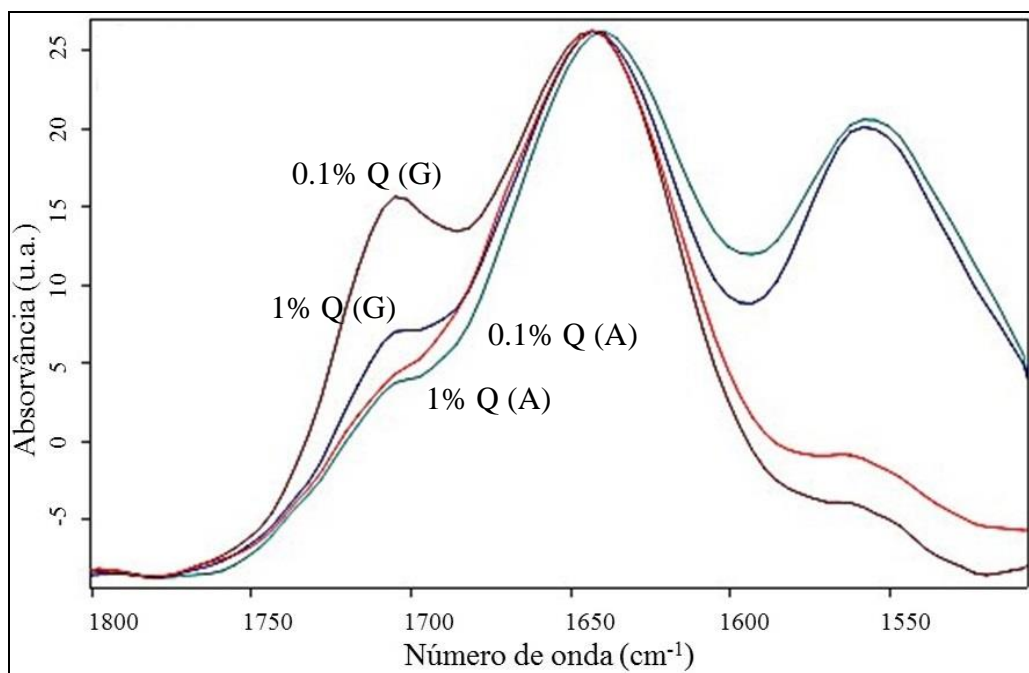
**Figura 3.16:** Média dos espectros de MID-IR na região espectral entre 1800 e  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Sistemas mistos do amido MPA adicionado de quitosana gelatinizados em  $\text{AcOH}$  0,1 mol/L. 0% Q (—), amido + 0.1% Q (—), amido + 0.3% Q (—), amido + 0.5% Q (—), amido + 1% Q (—).



**Figura 3.17:** Média dos espectros de MID-IR na região espectral entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Sistemas mistos do amido COM adicionado de quitosana gelatinizados em AcOH 0,1 mol/L. 0% Q (—), amido + 0,1% Q (—), amido + 0,3% Q (—), amido + 0,5% Q (—), amido + 1% Q (—).

Observou-se também que com o aumento da concentração da quitosana no sistema misto ocorreu menor formação do complexo amido-ácido acético. Na Figura 3.18 pode-se verificar que a banda do ácido acético é mais pronunciada para os sistemas gelatinizados quando comparados com o correspondente não gelatinizado. Ou seja, a gelatinização aumenta a formação do complexo amido-ácido acético o que parece normal em função da ruptura do grânulo e lixiviação da amilose. No caso da presença da quitosana esta parece diminuir a formação deste complexo. A banda mais intensa para o ácido acético corresponde ao amido gelatinizado com 0,1% de quitosana, enquanto a intensidade para o sistema com quitosana a 1% é bem mais baixa comparativamente. Isto significa que a quitosana dificulta a formação do complexo amido-ácido acético.

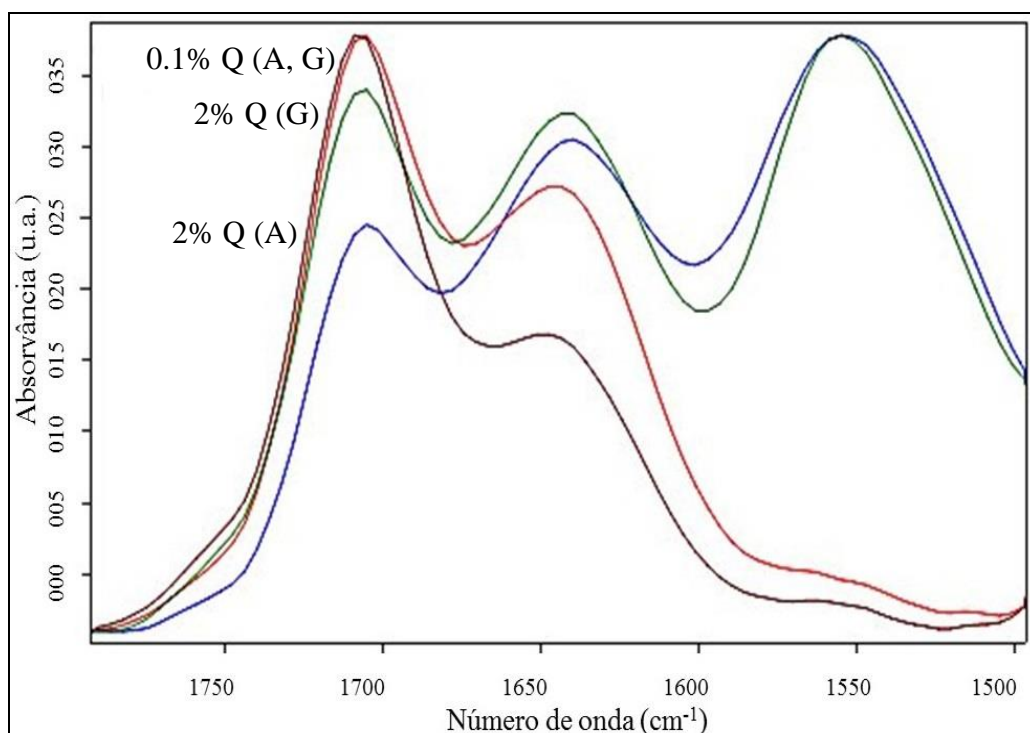




**Figura 3.18:** Média dos espectros de MID-IR na região espectral entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Sistemas mistos do amido MPA adicionado de quitosana gelatinizados em AcOH 0,1 mol/L. (A): antes da gelatinização, (G) após a gelatinização. (—) amido + 0,1% Q (A), (—) amido + 0,1% Q (G), (—) amido + 1% Q (A), (—) amido + 1% Q (G).

No caso dos sistemas mistos de amido e quitosana gelatinizados em ácido acético a 1 mol/L, a banda da amina apresentou o mesmo deslocamento dos sistemas mistos anteriores (Figura 3.19). Através dos ensaios reológicos foi observado que o amido sofreu certo grau de hidrólise na sua estrutura quando gelatinizado em condições mais ácidas. Este efeito do ácido sobre o amido poderia também estar relacionado com a alta intensidade da banda referente à presença de ácido acético nos espectros do MID-IR, existindo uma maior proporção de cadeias lineares pode haver um maior número de complexos com o ácido acético. À semelhança dos sistemas em ácido acético 0,1 mol/L o aumento da concentração de quitosana parece inibir a formação dos complexos amido-ácido acético, contudo o efeito não foi tão pronunciado como no caso do ácido acético 0,1 mol/L. Acrescenta-se que nas outras regiões espectrais nenhuma alteração foi observada referindo-se a todos os sistemas mistos em análise.





**Figura 3.19:** Média dos espectros de MID-IR na região espectral entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Sistemas mistos do amido COM adicionado de quitosana antes (A) e após a gelatinização (G) em AcOH 1 mol/L. (—) amido + 0.1% Q (A), (—) amido + 0.1% Q (G), (—) amido + 2% Q (A), (—) amido + 2% Q (G).

Assim, através das observações realizadas nos espectros dos sistemas mistos amido/quitosana pode-se concluir que o amido interage com a quitosana ocasionando um deslocamento no número de onda referente à amina, apesar de este não ser muito intenso. Entretanto as alterações nos espectros foram semelhantes para os amidos gelatinizados em ácido acético quer a 0,1 mol/L quer a 1 mol/L. As diferenças entre os géis mistos provenientes da gelatinização nestes dois meios e, observadas através da reologia, deverão ser resultado de uma organização diferenciada das cadeias do amido em menor tamanho, resultado de determinada extensão de hidrólise ocorrida durante o aquecimento em AcOH 1 mol/L.

### **3.3.5 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)**

Através do DSC foi estudado o efeito da quitosana sobre as propriedades térmicas do amido, nomeadamente quando este é submetido ao processo de gelatinização e posterior retrogradação. Estes processos foram analisados nas amostras em AcOH 0,1 mol/L utilizando-se os mesmos parâmetros previamente definidos no capítulo 2 (item 2.3.6): temperatura inicial da transição ( $T_0$ ); temperatura de pico ( $T_p$ ); temperatura de conclusão ( $T_c$ ); entalpia de gelatinização e retrogradação ( $\Delta H_{gel}$ ,  $\Delta H_{ret}$ ); faixa de temperatura de gelatinização e retrogradação ( $R_{gel}$ ,  $R_{ret}$ ), índice de altura do pico ( $PHI$ ) e percentagem de retrogradação ( $R$ ).

#### **3.3.5.1 Efeito da Quitosana na Gelatinização do Amido**

Na Tabela 3.6 estão apresentados os resultados obtidos para as temperaturas que correspondem às transições do processo de gelatinização, bem como as respetivas entalpias, faixas de temperatura de gelatinização e índices de altura do pico, para as suspensões de amido na concentração de 20% (m/m) e amido adicionado de quitosana (0.1, 0.3, 0.5 e 1%). Todos os termogramas resultantes apresentaram um pico definido na região entre 60 e 85 °C (semelhante a Figura 2.10).

Como pode ser observado, através dos resultados obtidos no DSC, a adição da quitosana conduziu a um aumento da temperatura inicial do processo de gelatinização do amido ( $T_0$ ). De acordo com o nosso conhecimento, até o momento, somente o trabalho realizado por Xu e colaboradores (2012) analisa as propriedades térmicas do amido na presença da quitosana. Os autores formularam sistemas mistos com 8% de amido de milho e adicionaram quitosana nas concentrações de 1, 3 e 5% (AcOH 0.2%). Contrariamente aos resultados obtidos no presente trabalho, os autores não observaram alteração significativa nos parâmetros obtidos através do DSC (o controlo apresentou  $T_0$  de 69.2 °C e a adição de 5% de quitosana alterou a  $T_0$  para 69.8 °C). De acordo com BeMiller (2011) diferenças na preparação dos sistemas mistos influenciam nos resultados e pode ser uma das causas da não correlação entre os resultados do presente estudo e os obtidos pelos referidos autores (não citam a preparação inviabilizando uma comparação neste sentido).

**Tabela 3.6:** Propriedades térmicas resultantes do processo de gelatinização dos sistemas mistos de amido (MPA e COM) e quitosana em AcOH 0,1 mol/L.

	Gelatinização					
	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_{gel}$ (J/g)	$R_{gel}$ (°C)	$PHI$ (Jg <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )
<b>MPA 20%</b>	<b>66.9</b> ± 0.8	<b>72.6</b> ± 0.0	<b>78.0</b> ± 0.1	<b>12.2</b> ± 0.3	<b>11.5</b> ± 1.6	<b>2.1</b> ± 0.2
<b>MPA 20% + 0.1% Q</b>	<b>67.8</b> ± 0.6	<b>72.9</b> ± 0.6	<b>78.0</b> ± 0.4	<b>11.5</b> ± 0.0	<b>10.3</b> ± 0.1	<b>2.2</b> ± 0.0
<b>MPA 20% + 0.3% Q</b>	<b>67.1</b> ± 0.4	<b>73.2</b> ± 0.4	<b>78.5</b> ± 0.6	<b>12.8</b> ± 0.3	<b>12.2</b> ± 1.7	<b>2.1</b> ± 0.2
<b>MPA 20% + 0.5% Q</b>	<b>67.7</b> ± 1.3	<b>73.3</b> ± 0.4	<b>78.5</b> ± 0.3	<b>11.2</b> ± 0.6	<b>11.3</b> ± 2.4	<b>2.0</b> ± 0.3
<b>MPA 20% + 1% Q</b>	<b>69.0</b> ± 1.6	<b>74.6</b> ± 1.1	<b>80.1</b> ± 1.1	<b>10.4</b> ± 1.3	<b>11.2</b> ± 1.1	<b>1.9</b> ± 0.4
<b>COM 20%</b>	<b>64.7</b> ± 0.1	<b>71.2</b> ± 0.6	<b>77.2</b> ± 1.3	<b>13.5</b> ± 1.1	<b>13.1</b> ± 1.0	<b>2.1</b> ± 0.3
<b>COM 20% + 0.1% Q</b>	<b>64.8</b> ± 1.5	<b>71.6</b> ± 0.1	<b>77.3</b> ± 1.1	<b>9.2</b> ± 0.9	<b>13.7</b> ± 2.7	<b>1.4</b> ± 0.4
<b>COM 20% + 0.3% Q</b>	<b>65.7</b> ± 0.0	<b>72.0</b> ± 1.3	<b>77.2</b> ± 2.1	<b>9.5</b> ± 1.2	<b>12.5</b> ± 2.7	<b>1.6</b> ± 0.5
<b>COM 20% + 0.5% Q</b>	<b>65.5</b> ± 0.7	<b>71.6</b> ± 0.1	<b>77.0</b> ± 0.1	<b>9.6</b> ± 1.5	<b>12.1</b> ± 1.6	<b>1.6</b> ± 0.5
<b>COM 20% + 1% Q</b>	<b>66.9</b> ± 0.1	<b>72.5</b> ± 0.3	<b>77.5</b> ± 0.4	<b>11.4</b> ± 0.5	<b>11.3</b> ± 0.4	<b>2.0</b> ± 0.2

$T_0$ : temperatura inicial,  $T_p$ : temperatura de pico,  $T_c$ : temperatura de conclusão,  $\Delta H_{gel}$ : entalpia de gelatinização,  $R_{gel}$ : faixa de gelatinização 2 ( $T_p - T_0$ ) e  $PHI$ : índice de altura de pico  $\Delta H_{gel} / (T_p - T_0)$ . Os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios ± desvio padrão.

Em estudos realizados com o DSC, visando à análise dos efeitos de diferentes hidrocolóides sobre a gelatinização dos grânulos de amido, a  $T_0$  geralmente aumenta ou não é alterada (BeMiller, 2011). Como exemplo comparativo cita-se o trabalho realizado por Ferrero *et al.* (1996), no qual foram estudadas as gomas xantana, guar e de alfarroba além de carboximetilcelulose e alginato de sódio em sistemas mistos com amido de milho. Na proporção de hidrocolóide/amido de 1:2 a  $T_0$  variou de 65.4 °C (controlo) para 67.1,

66.6, 67.5, 69.7 e 68.4 °C respectivamente. Os autores concluem que a adição dos hidrocolóides demonstrou um significativo efeito sobre a gelatinização do amido de milho, havendo aumento da  $T_0$  com o aumento da concentração das gomas e sendo este efeito mais evidente com a adição de hidrocolóides com cargas (carboximetilcelulose e alginato de sódio).

As outras temperaturas de transições térmicas, nomeadamente a temperatura de pico ( $T_p$ ) e de conclusão ( $T_c$ ) aumentaram com a adição da quitosana enquanto as entalpias ( $\Delta H_{gel}$ ) tenderam a diminuir. Nestes parâmetros, Xu *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes ao presente trabalho quanto a  $T_p$  e  $T_c$  e as entalpias praticamente não alteraram com a adição da quitosana. Comumente os hidrocolóides ocasionam o aumento da  $T_p$  e  $T_c$  e a diminuição das entalpias (BeMiller, 2011).

Quanto à faixa de temperatura de gelatinização ( $R_{gel}$ ) que basicamente reflete se o processo de gelatinização ocorre em um intervalo de temperatura maior ou menor, foi observada uma resposta pouco conclusiva mas com tendência à diminuição deste intervalo com a adição da quitosana, assim como do índice de altura de pico ( $PHI$ ) que é um indicativo da uniformidade na gelatinização do amido (pouca variação).

#### 3.3.5.2 Efeito da Quitosana na Retrogradação do Amido

Com o objetivo de verificar o efeito da adição da quitosana sobre a retrogradação do amido as cápsulas contendo os géis foram armazenadas a 4 °C durante 7, 14 e 40 dias e novamente submetidas ao aquecimento no calorímetro. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.7. As endotermas obtidas após este segundo, terceiro e quarto ciclo de aquecimento apresentaram escaneamentos em que apareceram pequenos e múltiplos picos (principalmente após 14 e 40 dias de armazenamento e nos géis do amido COM), inviabilizando a medição. Devido a este fator são apresentados os resultados dos géis com o amido MPA considerando somente as endotermas definidas e que possibilitaram a análise da retrogradação. Isto porque, se considerados estes resultados ajudam a concluir que, nos géis analisados e sob as condições testadas, a quitosana não auxiliou na restrição da retrogradação do amido. A retrogradação nos géis aumentou quer com o aumento da

quitosana quer com o tempo de armazenamento (observando-se pouca variação da primeira para a segunda semana de armazenamento). Este resultado pode indicar uma separação de fases entre os biopolímeros durante o armazenamento e este fator pode ter influenciado na não reprodutibilidade das endotermas. Xu *et al.* (2012) também analisaram os géis mistos de amido e quitosana após 7 e 30 dias de armazenamento a 4 °C e também concluem que não ocorre inibição da retrogradação do amido na presença da quitosana.

**Tabela 3.7:** Propriedades térmicas após a retrogradação dos géis mistos de amido (MPA 20%) e quitosana em AcOH 0,1 mol/L.

	Retrogradação (7 dias)						Retrogradação (14 dias)						Retrogradação (40 dias)					
	$T_0$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H_{ret}$	$R_{ret}$	$R$	$T_0$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H_{ret}$	$R_{ret}$	$R$	$T_0$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H_{ret}$	$R_{ret}$	$R$
	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(%)
<b>Controlo</b>	<b>39.2</b>	<b>54.3</b>	<b>64.6</b>	<b>7.3</b>	<b>30.2</b>	<b>59.5</b>	<b>38.1</b>	<b>52.9</b>	<b>64.8</b>	<b>7.6</b>	<b>29.6</b>	<b>63.3</b>	<b>40.0</b>	<b>53.0</b>	<b>64.0</b>	<b>9.2</b>	<b>26.0</b>	<b>75.3</b>
	±0.8	±1.0	±1.1	± 0.1	±3.7	± 2.0							±0.8	±0.5	±1.6	± 0.8	±2.5	± 5.2
<b>+ 0.1% Q</b>	<b>38.2</b>	<b>53.5</b>	<b>64.0</b>	<b>8.0</b>	<b>30.6</b>	<b>69.1</b>	<b>39.6</b>	<b>53.5</b>	<b>64.4</b>	<b>7.6</b>	<b>27.9</b>	<b>66.1</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	±1.6	±0.9	±1.2	± 1.1	±1.4	± 9.2	±2.6	±1.7	±1.8	± 0.8	±1.8	±7.4						
<b>+ 0.3% Q</b>	<b>37.7</b>	<b>53.8</b>	<b>63.8</b>	<b>8.2</b>	<b>32.3</b>	<b>64.1</b>	<b>39.1</b>	<b>53.0</b>	<b>63.7</b>	<b>7.5</b>	<b>27.8</b>	<b>58.7</b>	<b>40.8</b>	<b>54.7</b>	<b>69.9</b>	<b>10.4</b>	<b>27.8</b>	<b>82.5</b>
	±0.6	±1.0	±1.1	± 0.3	±0.7	± 3.6	±1.3	±1.5	±0.6	± 0.6	±0.3	±5.7						
<b>+ 0.5% Q</b>	<b>38.8</b>	<b>53.8</b>	<b>64.6</b>	<b>7.8</b>	<b>29.9</b>	<b>69.5</b>	<b>42.1</b>	<b>53.9</b>	<b>64.2</b>	<b>7.8</b>	<b>23.6</b>	<b>67.2</b>	<b>38.1</b>	<b>54.2</b>	<b>66.6</b>	<b>11.6</b>	<b>32.0</b>	<b>100</b>
	±1.6	±0.6	±0.4	± 0.8	±1.8	±10.5												
<b>+ 1% Q</b>	<b>38.7</b>	<b>53.9</b>	<b>64.2</b>	<b>7.6</b>	<b>30.4</b>	<b>74.1</b>	<b>38.7</b>	<b>53.5</b>	<b>64.9</b>	<b>8.2</b>	<b>29.6</b>	<b>79.3</b>	<b>41.6</b>	<b>52.1</b>	<b>62.5</b>	<b>9.0</b>	<b>21.0</b>	<b>95.7</b>
	±1.3	±1.6	±2.1	± 0.1	±0.6	±11.0	±2.0	±2.3	±1.8	± 0.2	±1.1	±8.2						

$T_0$ : temperatura inicial,  $T_p$ : temperatura de pico,  $T_c$ : temperatura de conclusão,  $\Delta H_{ret}$ : entalpia de retrogradação,  $R_{ret}$ : faixa de retrogradação 2 ( $T_p - T_0$ ),

$R$ : % retrogradação ( $\Delta H_{ret} / \Delta H_{gel}$ )

Os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios ± desvio padrão.

(n.d.) não detetado.

### 3.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, analisou-se o efeito da quitosana em sistemas mistos com o amido gelificados em condições distintas. Este biopolímero demonstrou alterar as propriedades do amido e os resultados obtidos demonstraram diferenças quando o processo de gelatinização foi realizado em meio aquoso acidificado com ácido acético 0,1 mol/L comparado ao realizado em 1 mol/L de ácido. Com relação às análises reológicas, a quitosana promoveu um aumento significativo na temperatura de início do processo de gelatinização demonstrando que, quanto maior a quantidade adicionada ao sistema, mais energia é necessário fornecer para que o grânulo de amido inicie a rutura das ligações de hidrogénio que mantém a sua estrutura. Durante o aquecimento a lixiviação da amilose para o meio aquoso foi dificultada na presença da quitosana, diminuindo o desenvolvimento de  $G'$  e prorrogando também a temperatura em que inicia a rutura granular. Na presença da quitosana a estruturação dos géis durante o arrefecimento ocorreu para menores temperaturas e com relação aos controlos no meio ácido a 0,1 mol/L ocorreu restrição das ligações de hidrogénio enquanto no meio a 1 mol/L ocorreu efeito contrário. Os espectros mecânicos demonstraram não haver diferença significativa no comportamento viscoelástico com relação ao controlo quando a gelatinização foi realizada em AcOH 0,1 mol/L. Entretanto, a gelatinização em meio ácido a 1 mol/L de concentração demonstrou que a quitosana neste meio auxiliou na firmeza dos géis que apresentaram maior carácter elástico que o controlo. Os espectros de infravermelho mostraram que existe a formação de complexos entre o amido e o ácido acético, os quais são mais evidentes na concentração de 1 mol/L. Com a introdução da quitosana nos sistemas ficou evidente que a formação destes complexos diminui, o que pode estar relacionado a uma menor lixiviação de amilose em função do aumento da concentração de quitosana. Através do MID-IR foi verificado que nos sistemas mistos ocorre um deslocamento no número de onda da banda referente à amina da quitosana (região de  $1550\text{ cm}^{-1}$ ), entretanto, sem diferença entre os sistemas formulados nas diferentes concentrações molares do ácido. Assim, pode-se concluir que as diferenças na viscoelasticidade dos géis de amido com quitosana, observadas no meio mais ácido, deverão ser provenientes de uma organização diferenciada entre os biopolímeros e não resultado de maior ou menor interação entre eles. As análises térmicas demonstraram que a quitosana altera as temperaturas de transições de fase do amido suportando o

aumento da temperatura de gelatinização também observado na reologia. Com relação à retrogradação do amido a quitosana não se demonstrou eficaz na inibição ou retardamento da reorganização macromolecular na rede dos géis ao longo do tempo.







***Capítulo 4-*** Influência de Galactomananas,  
Polissacarídeos Neutros, na Gelatinização e  
Retrogradação do Amido

---



## **4.1 INTRODUÇÃO**

À semelhança do capítulo anterior, o presente estudo visa analisar sistemas mistos de amido com outros hidrocolóides. Neste caso, o interesse foi direcionado às galactomananas que são biopolímeros neutros e foram selecionadas devido às suas diferentes estruturas com relação à proporção de galactose na cadeia principal de manose (goma guar, goma de alfarroba e goma cassia). As gomas guar e de alfarroba são as mais comumente utilizadas e estudadas (Prajapati *et al.*, 2013a) ao contrário da goma cassia (Kaur *et al.*, 2008). No setor industrial as tendências requerem a introdução de fontes alternativas e renováveis sendo que, nos próximos anos, haverá um contínuo interesse pelas galactomananas e suas potencialidades (Prajapati *et al.*, 2013a). Por este motivo, optou-se por realizar, nesta etapa do trabalho, um estudo comparativo entre os efeitos que estes biopolímeros ocasionam no amido durante os processos de gelatinização e retrogradação, explorando assim a goma cassia que é uma galactomanana menos ramificada e ainda pouco conhecida e estudada. Como já referido, a combinação de diversos hidrocolóides com o amido é uma maneira de alterar as suas propriedades sem precisar recorrer a modificações na sua estrutura.

Na literatura encontram-se estudos antigos e recentes com sistemas mistos de amido e galactomananas envolvendo os mais variados tipos de amidos (nativos e modificados) e diferentes metodologias, incluindo medições de viscosidade (Brabender, RVA), comportamento viscoelástico (ensaios de oscilação a baixa amplitude de deformação), propriedades térmicas (DSC) e microestrutura (MEV, CLSM) (Sudhakar *et al.*, 1996; Kulicke *et al.*, 1996; Ferrero *et al.*, 1996; Biliaders *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1999; Ahmad e Williams, 2001; Lee *et al.*, 2002; Krüger *et al.*, 2003; Korus *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2005; Funami *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c; Chaisawang e Supphantharika, 2005; Dolz *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2006; Chaisawang e Supphantharika, 2006; Ptaszek e Grzesik, 2007; Kowalski *et al.*, 2008; Funami *et al.*, 2008a, 2008b; Choi e Yoo, 2008; Nagano *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2008; Ptaszek *et al.*, 2009; Huang, 2009; Arocas *et al.*, 2009; Sikora *et al.*, 2010; Rosell *et al.*, 2011; Šubarić *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013).

A maioria das misturas de amidos e galactomananas têm sido associadas com um efeito sinérgico (ex.: aumento da viscosidade e dos módulos viscoelásticos), podendo ou não ocorrer associação intermolecular e sendo comum a incompatibilidade termodinâmica e a separação de fases na qual o polímero adicionado enriquece a fase contínua (BeMiller, 2011). Na revisão realizada por Funami (2009), quanto ao mecanismo do que ocorre entre o amido e as galactomananas, o autor faz referência às associações moleculares durante os processos de gelatinização e retrogradação. Durante a gelatinização do amido, geralmente observa-se a diminuição da temperatura em que se observa o aumento da viscosidade (RVA), devido à presença da galactomanana, para baixas concentrações de amido, atribuída ao melhoramento de associações entre as galactomananas e a amilose lixiviada, ao passo que para sistemas com concentrações elevadas normalmente observa-se um aumento desta temperatura, atribuído à diminuição destas associações pelo aumento da fração de amido na fase contínua. Neste último caso, outra possibilidade seria devido à diminuição da lixiviação da amilose diminuindo as associações. Desta forma, tem-se observado diferentes respostas em virtude da concentração de amido no sistema misto. Com relação à estrutura das galactomananas existem observações de que a quantidade de amilose lixiviada do amido decresce em função do aumento da massa molecular das galactomananas e da quantidade de galactose na cadeia principal constituída por manose. O efeito das galactomananas sobre a retrogradação do amido em longo prazo tem sido positivo em termos da diminuição deste processo. Pressupõe-se que este efeito positivo ocorra devido à associação molecular entre as galactomananas e a amilopectina, para além de outro fator que é a estabilização das moléculas de água (a ligação das galactomananas com as moléculas da água ocasiona a prevenção da retrogradação do amido).

Como exemplo destas observações supracitadas descreve-se os seguintes trabalhos que foram realizados com enfoque na gelatinização e retrogradação do amido em sistemas mistos com galactomananas. Funami *et al.* (2005a) utilizaram amido de trigo (13%) e as galactomananas guar, alfarroba e tara. Com 1% das gomas foi observado que o aumento da viscosidade (*peak viscosity* - RVA) apresentou relação inversa com a massa molecular e com a razão de manose/galactose (alfarroba > tara > guar) enquanto que a temperatura inicial em que a viscosidade aumentou foi menor em relação ao controlo (correlacionada com a incompatibilidade termodinâmica) e a efetividade na diminuição da

temperatura foi relacionada com a massa molecular e com a razão manose/galactose sendo a guar mais efetiva que a tara e na sequência a de alfarroba. Através dos espectros mecânicos foi observado que as gomas aumentaram o caráter viscoso em relação ao controlo (aumento da  $\tan \delta$  na ordem: guar > tara > alfarroba). A retrogradação do amido avaliada através do DSC (após armazenamento durante 5, 7 e 14 dias a 4 °C) demonstrou diminuição com as galactomananas (guar > tara > alfarroba). Os mesmos autores (2005b) também analisaram o efeito da goma guar com diferentes massas moleculares sobre a gelatinização do amido de milho com diferentes proporções de amilose/amilopectina. Para 5% de amido a temperatura correspondente ao brusco aumento da viscosidade durante o aquecimento diminuiu devido à presença da goma guar e foi independente da massa molecular da goma sendo que, um efeito contrário foi observado com o amido a 15% (aumento da temperatura em relação ao controlo e com aumento da massa molecular da goma). No primeiro caso, o aumento da viscosidade para menor temperatura foi associado com interações entre a guar e a amilose e com a maior concentração de amido na fase contínua, ao passo que com 15% de amido a prorrogação da temperatura (com dependência da massa molecular da goma) foi associada ao decréscimo da lixiviação da amilose pelo aumento da viscosidade na fase contínua. Neste estudo ocorreu aumento da viscosidade (*peak viscosity*) com o aumento da massa molecular da goma guar (quer com 5% quer com 15% de amido). Na segunda avaliação compararam-se amidos com teores diferentes de amilose (14, 26 e 50%) e foi mantida a massa molecular da guar, assim como a concentração do amido (15%) e da goma (0.5%). Para amidos com menor concentração de amilose (14 e 26%) a temperatura em que o aumento da viscosidade foi observado foi maior em relação aos controlos. O contrário foi observado para o amido com 50% de amilose. De acordo com os autores estas observações suportam a hipótese de que interações entre a guar e a amilose são responsáveis pela antecipação da temperatura em que a viscosidade aumenta. O outro parâmetro analisado foi a viscosidade máxima (*peak viscosity*), a qual aumentou em relação aos controlos quer com o amido a 14% e 26% de amilose quer com 50% de amilose com as gomas guar com maiores massas moleculares. Somente com a guar de menor massa molecular houve diminuição da viscosidade em relação aos controlos (independente do teor de amilose no amido). Os amidos com menor percentagem de amilose apresentaram maior viscosidade e, através destas respostas, os autores concluem que interações entre a amilopectina e a guar são responsáveis pelo

aumento da viscosidade. Assim, interações entre a guar e a amilose foram correlacionadas com a temperatura em que a viscosidade aumenta enquanto interações entre a guar e a amilopectina foram atribuídas ao aumento da viscosidade. Variações no tipo e concentração do amido, nos teores de amilose/amilopectina, na massa molecular e na razão de manose/galactose das galactomananas são fatores que influenciam nas interações dos sistemas mistos, resultando na modificação da textura dos produtos a base de amido com a adição das galactomananas.

Já referiu-se no capítulo anterior que, devido às potencialidades de combinação de diferentes polissacarídeos nos sistemas alimentares, as pesquisas nesta área são constantes e diversificadas. Durante os últimos cinco anos, com relação ao amido e as galactomananas, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter novas combinações sinérgicas, de certificar e de melhor compreender o efeito sobre as propriedades do amido. Na sequência são apresentados alguns destes trabalhos para demonstrar um pouco das tendências das investigações. Huang (2009) analisou a influência das gomas guar e de alfarroba (0.5%) sobre as propriedades físico-químicas, de pasta (RVA) e térmicas (DSC) de amidos de inhame e batata (8%). Com a adição das gomas o autor observou diminuição do inchamento e solubilidade dos amidos, aumento da viscosidade e os parâmetros térmicos como temperatura inicial de gelatinização ( $T_0$ ) apresentaram-se sem alteração, temperatura de pico ( $T_p$ ) e faixa de gelatinização ( $R_{gel}$ ) com um pequeno aumento e as entalpias de gelatinização ( $\Delta H$ ) tiveram uma diminuição pouco significativa ou não foram alteradas (dependendo do amido).

Arocas *et al.* (2009) adicionaram goma de alfarroba a amidos de milho normal e com alto teor de amilopectina, amido de batata e amido de arroz para analisar a estabilidade em molho branco sobre o congelamento e descongelamento. As formulações foram feitas com 0.15% da goma e 6% dos amidos (adicionados de água, leite desnatado e sal). Através dos espectros mecânicos foi observado que, nos molhos frescos, a goma em comparação com os controles ocasionou aumento dos módulos viscoelásticos ( $G'$  e  $G''$ ) e dependendo do amido a  $\tan \delta$  aumentou ou diminuiu (caráter mais viscoso e elástico, respetivamente). A comparação dos espectros mecânicos dos molhos frescos com os que foram mantidos a 18 °C durante 4 dias demonstrou aumento dos módulos após este



processo. Entretanto, na presença da goma os módulos diminuíram em relação aos controlos e aumentaram menos quando comparados aos molhos frescos. De acordo com os autores, esta resposta indica maior estabilidade na presença da goma (provavelmente em consequência de interações entre a goma e a amilose, diminuindo a interação amilose/amilose).

Sikora *et al.* (2010) analisaram a influência de diferentes hidrocolóides (0.2%), entre eles as galactomananas guar e de alfarroba, adicionados ao amido de batata (5%) que foi fracionado de acordo com o tamanho dos grânulos (grandes, médios e pequenos). Nas análises realizadas em um Brabender, independente do hidrocolóide adicionado, a viscosidade diminuiu com o tamanho dos grânulos. A temperatura em que se observou a elevação da viscosidade decresceu em relação aos controlos para todos os hidrocolóides (exceto para a goma arábica). As gomas de alfarroba, xantana e carragenina foram as que diminuíram mais a temperatura com os grânulos de amido maiores, ao passo que as outras gomas apresentaram esta resposta mais intensa com a fração de grânulos médios. Nos espectros mecânicos, independente do hidrocolóide, nos géis de amido com grânulos menores os módulos viscoelásticos diferiram dos géis obtidos com as outras frações de amido.

Šubarić *et al.* (2011) analisaram o efeito das galactomananas guar e de alfarroba (0.5 e 1.25%) na gelatinização do amido de mandioca e milho (40%) através de análises térmicas (DSC). Em relação aos controlos as galactomananas pouco alteraram a  $T_0$  e  $T_p$ . Em ambos os amidos a goma de alfarroba causou um aumento na  $T_0$  (inferior a 0.5 °C) enquanto a guar causou uma diminuição também pouco significativa. A  $T_c$  somente apresentou um significativo aumento no amido de mandioca adicionado da goma guar (80.5 °C para 86.1 °C). Nas entalpias de gelatinização ( $\Delta H$ ) foi observado decréscimo com relação aos controlos (atribuído à redução da disponibilidade de água para o amido) e ligeiramente inferior com a goma guar. A retrogradação foi analisada após 7 e 14 dias de armazenamento a 4 e 25 °C. As galactomananas diminuíram a retrogradação de ambos os amidos quer a 4 °C quer a 25 °C. No amido de mandioca a guar foi mais efetiva e no amido de milho a alfarroba apresentou melhor efeito na redução da retrogradação.

Kim *et al.* (2013) analisaram o efeito da galactomanana guar entre outros hidrocolóides (xantana, carboximetilcelulose, alginato de sódio, hidroxipropilmetilcelulose e carrageninas) em sistemas mistos com o amido de arroz com diferença no conteúdo de amilose (0, 15, 22 e 28%). Os experimentos foram conduzidos em termos da viscosidade (RVA) e comportamento viscoelástico (espectros mecânicos). Os resultados demonstraram que a viscosidade máxima diminuiu com o aumento do conteúdo de amilose no amido, com e sem a adição dos hidrocolóides, ou seja, a presença dos hidrocolóides não alterou o padrão da viscosidade máxima em função do conteúdo de amilose. Para a maioria das combinações a viscosidade final foi maior em comparação aos controles. Com a goma guar a viscosidade final foi das mais elevadas aumentando com o teor de amilose no amido (ao contrário de Funami *et al.*, (2005b) que observaram relação entre o menor conteúdo de amilose com a maior viscosidade). Nos espectros mecânicos, quer os géis de amido quer os mistos aumentaram o caráter elástico com o aumento da amilose (diminuição da  $\tan \delta$ ).

Torres *et al.* (2013) analisaram as propriedades térmicas (DSC) da farinha e amido de castanha em diferentes níveis de hidratação (40, 50, 60 e 95%) assim como a influência da goma guar (0.5, 1, 1.5 e 2%). Os sistemas mistos com a goma foram analisados a 50% de hidratação e em termos do processo de gelatinização. Os resultados demonstraram que a goma alterou as temperaturas de transição ( $T_0$ ,  $T_p$  e  $T_c$ ) e aumentou as entalpias ( $\Delta H$ ), ao contrário do observado por Šubarić *et al.* (2011). Entre 0.5 e 2% de goma a  $T_0$  apresentou uma elevação na ordem de  $\pm 1$  °C (acima de 1% o aumento não foi considerado significativo). Esta resposta foi observada quer na farinha quer no amido. Em conclusão os autores relatam que a guar alterou as características térmicas do amido e da farinha de castanha de maneira semelhante.

Heyman *et al.* (2014) analisaram o comportamento reológico do amido de milho com alto teor de amilopectina em sistemas mistos com a galactomanana guar e a goma xantana (0.2 e 0.4%) em solução de NaCl 0.01 mol/L (amido 5%). As gomas não tiveram efeito significativo no inchamento dos grânulos de amido, sendo a goma xantana mais efetiva do que a guar na inibição da rutura dos grânulos. Em conclusão ambas as gomas alteraram as propriedades reológicas dos sistemas sendo que na presença da goma xantana a estrutura dos grânulos foi menos afetada.

Como verificado, as galactomananas estão constantemente em investigações com relação às alterações que ocasionam nas propriedades do amido. Mesmo as gomas guar e de alfarroba, já bastante utilizadas, continuam atraindo interesse. Neste capítulo, o efeito da adição das galactomananas guar, alfarroba e cassia foi avaliado sobre os processos de gelatinização e retrogradação do amido. Esta última goma é menos conhecida e possui uma estrutura consideravelmente menos ramificada quando comparada principalmente com a guar. Assim, à semelhança do capítulo anterior, os ensaios foram realizados em sistemas mistos utilizando-se o amido crioulo MPA 01 (MPA) e o amido comercial (COM) a 20% de concentração adicionados das galactomananas a 0.1, 0.3 e 0.5% (m/m) e foram avaliados os seguintes aspectos:

(1) Estudo do comportamento reológico dos sistemas mistos, utilizando ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação, incluindo: (a) ensaios de varrimento em temperatura e medição dos módulos viscoelásticos durante o ciclo de aquecimento (gelatinização) e durante o ciclo de arrefecimento (retrogradação - estruturação de pastas e/ou géis formados); (b) ensaios de varrimento em frequência de oscilação para avaliar as propriedades viscoelásticas finais de pastas e/ou géis formados (realizados após varrimento em temperatura e tempo); e (c) ensaios de varrimento em tempo (maturação) para avaliação das alterações estruturais com relação ao tempo (estabilização, enfraquecimento ou fortalecimento da estrutura formada);

(2) Estudo da microestrutura dos sistemas mistos de amido/galactomanana em comparação com os amidos controlos, antes e após o processo de gelatinização, recorrendo-se à microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e à microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM);

(3) Análise da interação do amido e das galactomananas através da espectroscopia de infravermelho (MID-IR);

(4) Estudo do efeito das galactomananas sobre as propriedades térmicas do amido (através do DSC), avaliando o processo de gelatinização e de retrogradação (7, 14 e 40 dias de armazenamento a 4 °C).

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 Materiais**

O amido da variedade crioula MPA 01 (MPA) e o amido comercial (COM) Maizena® (Unilever Jerónimo Martins Lda.) continuaram a ser os utilizados nesta etapa da pesquisa e as galactomananas comerciais foram: a goma cassia (GC) (gentilmente cedida pela Premcem Gums Pvt Ltd., Mumbai, India), a goma guar (GG) (Meyhall, control nº MR 2015) e a goma de alfarroba (GA) (Sigma-Aldrich®, CAS 9000-40-2).

### **4.2.2 Caracterização das Galactomananas**

#### *4.2.2.1 Determinação da Razão de Manose/Galactose por Cromatografia em Fase Gasosa*

A cromatografia em fase gasosa foi utilizada para a determinação da razão de manose/galactose das galactomananas utilizadas neste estudo (quantificação de açúcares neutros sob a forma de acetatos de alditol). O procedimento seguido para esta análise foi de acordo com o descrito por Coimbra *et al.* (1996).

As gomas (1-2 mg) foram dissolvidas em ácido sulfúrico (200 µL, 72%) à temperatura ambiente durante 3 horas. Após este período adicionou-se água destilada (concentração final de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol/L) e as amostras foram hidrolisadas durante 1 hora a 120 °C. Seguidamente os monossacarídeos obtidos foram convertidos para acetatos de alditol através da adição de borohidreto de sódio e anidrido acético. Após a dissolução dos acetatos de alditol em acetona anidra procedeu-se a análise por cromatografia de gás utilizando como padrão interno a 2-desoxi-glucose.

Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 (CR1) com detetor FID, equipado com uma coluna DB-225 com 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno e 0.15 µm de espessura de filme. O hidrogénio foi o gás de arraste com uma velocidade de fluxo de 1 mL/min. Após a injeção a temperatura foi mantida a 220 °C

durante 7 minutos e após este tempo foi aumentada até 230 °C (a 20 °C/min) e mantida durante 7 minutos. As temperaturas do injetor e do detetor foram mantidas a 220 e 230 °C respetivamente. A identificação e quantificação dos resíduos de manose e galactose foram realizadas através de comparação dos tempos de retenção com o de padrões de referência.

#### 4.2.2.2 Determinação da Viscosidade Intrínseca e da Massa Molecular Viscosimétrica

Para estas análises foram preparadas dispersões das galactomananas em água destilada, aproximadamente a 0.1%, por agitação magnética moderada durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida em aquecimento em banho de água a 85 °C durante mais 30 minutos, também sob agitação moderada. Seguidamente as soluções foram arrefecidas e centrifugadas por 20 minutos (24400 g) e os sedimentos descartados. Por último foi determinado o resíduo seco (105 °C, 12 h) para avaliar a concentração mássica final. Para a determinação da viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) de cada amostra, determinaram-se os tempos de escoamento de cada diluição (entre 0.01 a 0.05%) utilizando um viscosímetro capilar de Cannon-Fenske a  $25 \pm 0.1$  °C (em um banho de água ao qual estava acoplado o viscosímetro; adicionando-se 8 mL das soluções e realizando 5 medições para cada diluição provenientes de 2 preparações de cada goma). Através destas medições foram calculadas as viscosidades relativa ( $\eta_{rel}$ ) e específica ( $\eta_{esp}$ ) de cada amostra. Uma análise prévia foi realizada para escolher as diluições nas quais a  $\eta_{rel}$  ficasse no intervalo entre 1.2 e 2.0, condição em que a viscosidade é Newtoniana e adequada para a referida análise. Para os cálculos da  $[\eta]$  fez-se a aplicação das equações de Huggins e Kraemer (equação 4.1 e equação 4.2 respetivamente):

$$\eta_{esp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad \text{_____ (equação 4.1)}$$

$$(\ln \eta_{rel})/C = [\eta] + k''[\eta]^2 C \quad \text{_____ (equação 4.2)}$$

Sendo  $k'$  e  $k''$  os coeficientes de Huggins e Kraemer, respetivamente, e  $C$  a concentração das soluções dos biopolímeros.

Para a determinação das massas moleculares médias viscosimétricas ( $M_v$ ) foi

utilizada a relação de Mark-Houwink proposta por Doublier e Launay (1981), tendo em conta a razão de manose/galactose de cada amostra (equação 4.3):

$$[\eta] = 11,5 \times 10^{-6} ((1-\alpha) M_v)^{0,98} \quad \text{_____ (equação 4.3)}$$

Sendo  $\alpha = \text{gal}/(\text{man}+\text{gal})$ .

### **4.2.3 Preparação dos Sistemas Mistos de Amido e Galactomananas**

A concentração final de amido nos sistemas mistos foi estabelecida a 20% (m/m) variando-se a concentração adicionada das galactomananas de forma a se obterem as concentrações finais de 0.1, 0.3 e 0.5% (m/m).

As soluções de galactomananas foram preparadas como descrito anteriormente no item 4.2.2.2. As suspensões de amido foram preparadas por agitação magnética lenta, à temperatura ambiente, durante 1 hora. Na sequência, as suspensões foram lentamente adicionadas às soluções das galactomananas, sob agitação, para obtenção das concentrações finais desejadas. Os sistemas mistos ficaram em agitação sob vácuo por mais 1 hora e utilizados nas análises reológicas. Como controlos foram utilizadas suspensões de amido em meio aquoso (20% m/m) que foram deixadas em agitação lenta durante 2 horas antes das análises.

### **4.2.4 Caracterização do Comportamento Reológico**

Para o estudo do comportamento reológico dos sistemas mistos (amido/galactomananas) os métodos reológicos e o reómetro utilizados foram aqueles já descritos no capítulo anterior (sistema de placas paralelas, placa rugosa, 4 cm de diâmetro, 1.0 mm de gap - Bohlin®, CVO 120 HR).

Resumidamente, após colocação de cada amostra (polissacarídeos isolados ou em misturas) no sistema de medida do reómetro (placa inferior aquecida a 40 °C), realizaram-se as seguintes medições reológicas:

(1): Varrimento em temperatura: ciclo de aquecimento e arrefecimento de 40-90-20 °C (mantidos a 90 °C durante 10 min). Taxa de variação de temperatura: 1 °C/min, frequência de oscilação: 2 rad/s, amplitude de deformação: 1%;

(2): Varrimento em frequência de oscilação: gama de frequências entre 0.01 - 10 rad/s, temperatura constante de 20 °C e 1% de deformação;

(3): Varrimento em tempo: maturação dos sistemas durante 15 hrs a 20 °C;

(4): Varrimento em frequência de oscilação após maturação dos sistemas durante 15 hrs: gama de frequências entre 0.01 - 10 rad/s, temperatura constante de 20 °C e 1% de deformação.

Previamente realizaram-se varrimentos em tensão oscilatória para sistemas gelificados e arrefecidos a 20 °C, para a determinação da região viscoelástica de comportamento linear, definindo-se a amplitude de 1% a utilizar em todos os ensaios.

#### **4.2.5 Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)**

Os sistemas mistos (amido/galactomanana), antes e após a gelatinização no reómetro, foram congelados e liofilizados para a análise da estrutura através da microscopia eletrónica de varrimento. A preparação das amostras e os equipamentos utilizados seguem a descrição do item 3.2.2.4 do capítulo anterior. Foram adquiridas micrografias nas ampliações de 200, 700 e 2500 vezes, sob aceleração de voltagem de 15 kV.

#### **4.2.6 Microscopia Confocal de Varrimento a Laser (CLSM)**

A microscopia confocal foi utilizada para a análise da microestrutura dos géis. Quer o amido quer as galactomananas foram corados separadamente antes da preparação dos sistemas mistos (igualmente ao descrito no item 4.2.2.3). O procedimento descrito em Tromp *et al.* (2001) foi utilizado para a marcação dos biopolímeros. A rodamina B foi

adicionada diretamente na suspensão de amido ( $\pm 5 \mu\text{L/g}$  de amido) e para as gomas foi utilizado o fluorocromo isocianato de fluoresceína (FITC). O FITC (105 mg) foi misturado a 0.75 g de galactomanana, 300  $\mu\text{L}$  de piridina e 60  $\mu\text{L}$  de dibutil dilaurato de estanho em 75 mL de DMSO. Na sequência a mistura foi aquecida (95 °C) durante duas horas e o biopolímero foi precipitado com etanol (300 mL) e centrifugado. Após este processo fez-se uma dissolução em água quente (150 mL) seguida de congelamento e liofilização. As amostras foram pulverizadas e utilizadas para a preparação dos sistemas mistos. Após a preparação as misturas foram colocadas em uma lâmina escavada e coberta por uma lamela e encaminhadas ao reômetro. Foi realizado o mesmo ciclo de aquecimento e arrefecimento descrito no item 4.2.2.3. As análises das amostras foram realizadas em um microscópio Carl Zeiss *LSM 510 META* equipado com lasers emitindo uma radiação de comprimento de onda de 561 e 488 nm para a fluorescência da rodamina B e FITC respectivamente. O sinal de fluorescência foi recolhido em um *spectral gate* de 530-630 nm utilizando o *software Zeiss LSM 510 4.0* para o processamento. Foi utilizada uma ampliação de 40X.

#### **4.2.7 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)**

Para verificar se existem indicações sobre interações entre o amido e as galactomananas nos sistemas mistos que foram congelados e liofilizados, quer antes quer após a gelatinização realizada no reômetro, utilizou-se a espectroscopia de infravermelho (mesmo equipamento citado no item 3.2.2.1 do capítulo anterior).

Todos os espectros foram adquiridos na forma de absorvância ( $4000$  a  $500 \text{ cm}^{-1}$ ), com resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$  e 128 varrimentos. Utilizou-se uma porção suficiente das amostras para cobrir a célula do equipamento (armazenadas em exsiccador) e após a aquisição de cada espectro estas foram remexidas realizando-se nova aquisição. Cada amostra foi analisada cinco vezes com a realização de um branco entre a troca de amostra (*background*). Os espectros foram visualizados com o *software* OPUS® (versão 5.0).

#### **4.2.8 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)**

A adição das galactomananas e seus efeitos nas propriedades térmicas do amido



foram analisados utilizando as mesmas cápsulas e o mesmo calorímetro descrito no capítulo 2 item 2.2.2.13.1 (*Perkin-Elmer® Diamond DSC*).

Após a preparação os sistemas mistos foram inseridos nas cápsulas de alumínio ( $\pm 20$  mg) e realizadas as análises nas seguintes condições: atmosfera de azoto com fluxo de 40 mL/min, taxa de aquecimento 10 °C/min, temperatura inicial 20 °C e temperatura final 90 °C. Os parâmetros térmicos foram calculados como descrito no capítulo 2 e incluíram: temperatura inicial ( $T_0$ ), temperatura de pico ( $T_p$ ), temperatura de conclusão ( $T_c$ ), entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ), faixa de temperatura de gelatinização ( $R_{gel}$ ) e índice de altura do pico ( $PHI$ ).

Para analisar o efeito das galactomananas na retrogradação do amido as cápsulas com os sistemas mistos gelatinizados foram armazenadas durante 7, 14 e 40 dias, a 4 °C, e novamente submetidas à análise no calorímetro. Antes das análises as cápsulas foram deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente e reaquecidas em condições iguais as utilizadas durante a gelatinização. Os parâmetros térmicos foram os mesmos e calculados igualmente ao descrito no capítulo 2.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Caracterização das Galactomananas

#### 4.3.1.1 Determinação da Razão de Manose/Galactose por Cromatografia em Fase Gasosa

As galactomananas são constituídas essencialmente por monómeros de manose e galactose, sendo que a proporção de galactose na cadeia principal de manose é variável, dependendo da fonte, e conhecida como um dos principais parâmetros de diferenciação entre estes biopolímeros, afetando principalmente a solubilidade, o comportamento reológico em solução e as interações que podem estabelecer com outros biopolímeros (Prajapati *et al.*, 2013b). A Tabela 4.1 apresenta a razão de M/G das amostras utilizadas no presente trabalho (quanto maior a razão menor o grau de ramificação da galactomanana).

**Tabela 4.1:** Razão de manose/galactose das amostras comerciais de galactomananas: goma guar (GG), goma de alfarroba (GA) e goma cassia (GC).

Amostra	Manose/Galactose <sup>1</sup>
GG	1.52 ± 0.22
GA	3.29 ± 0.01
GC	6.34 ± 0.12

(<sup>1</sup>): Média de duas determinações ± desvio padrão.

Os resultados demonstram e confirmam que a goma guar é a mais substituída (ou seja, aproximadamente a cada dois monómeros de manose existe um de galactose), seguida da goma de alfarroba e da goma cassia (GG > GA > GC). Estes resultados obtidos foram semelhantes ao descrito na literatura que descreve a guar e a cassia como apresentando maior e menor substituição respetivamente, sendo citadas proporções de M/G de 2:1 (GG), 4:1 (GA) (Prajapati *et al.*, 2013a) e 5:1 (GC) (Kaur *et al.*, 2008).

#### 4.3.1.2 Determinação da Viscosidade Intrínseca e da Massa Molecular Viscosimétrica

A viscosidade intrínseca e a massa molecular são parâmetros importantes, interligados e geralmente determinados para a caracterização das galactomananas. A  $[\eta]$  é uma característica físico-química dependente da conformação da molécula, da massa molecular conforme mencionado e também do solvente em que se encontra e, por definição, está relacionada com a dimensão das cadeias ou volume hidrodinâmico ocupado pelas moléculas de um polímero (Lopes da Silva *et al.*, 2004). A Tabela 4.2 apresenta os valores da viscosidade intrínseca e das massas moleculares viscosimétricas que foram obtidos através das equações apresentadas no item 4.2.2.2.

**Tabela 4.2:** Viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) e massas moleculares médias viscosimétricas ( $M_v$ ) das amostras comerciais de galactomananas: goma guar (GG), goma de alfarroba (GA) e goma cassia (GC).

	$[\eta]$ (dL/g)	$M_v$ ( $\times 10^6$ )
<b>GG</b>	<b><math>16.1 \pm 1.9</math></b>	<b>3.09</b>
<b>GA</b>	<b><math>13.9 \pm 2.0</math></b>	<b>2.10</b>
<b>GC</b>	<b><math>11.6 \pm 0.5</math></b>	<b>1.55</b>

De acordo com os valores obtidos para as amostras em análise a GG é a galactomanana que apresenta a maior viscosidade intrínseca seguida pela GA e GC. As massas moleculares viscosimétricas confirmam as características comuns às galactomananas de apresentarem elevadas massas moleculares e estão em concordância com a diminuição da  $[\eta]$ , ou seja, o volume hidrodinâmico ocupado pelas galactomananas em solução aumentou com a  $M_v$  e também com o grau de ramificação nas gomas.

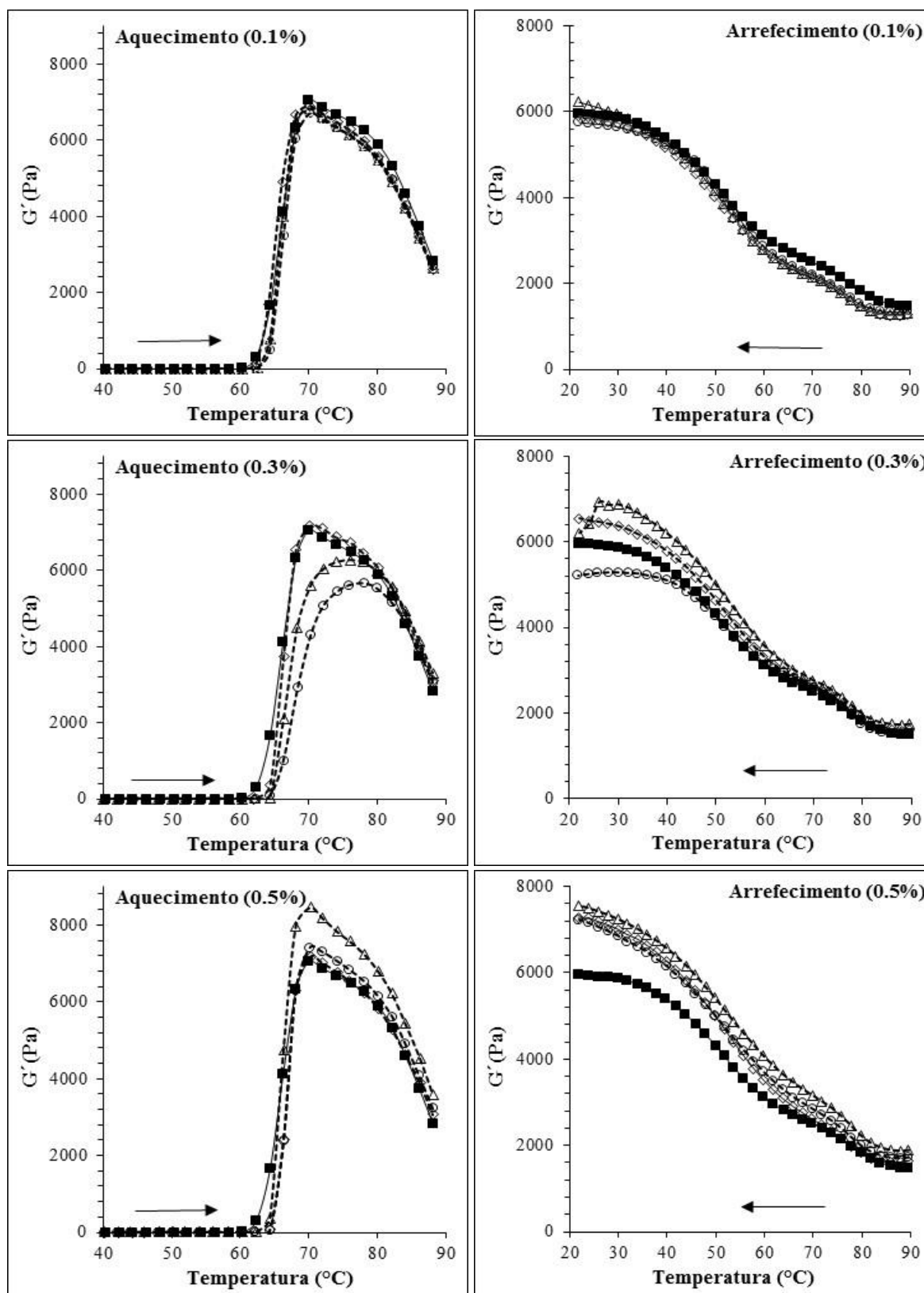
### **4.3.2 Caracterização do Comportamento Reológico**

A metodologia usada para a caracterização reológica dos sistemas amido-galactomananas foi semelhante à utilizada no capítulo anterior: Primeiro tratamento térmico com uma rampa de aquecimento (40-90 °C) e de arrefecimento (90-20 °C), seguido de um varrimento em frequência de oscilação, varrimento em tempo (maturação) a 20 °C e, finalmente, um último varrimento em frequência a 20 °C.

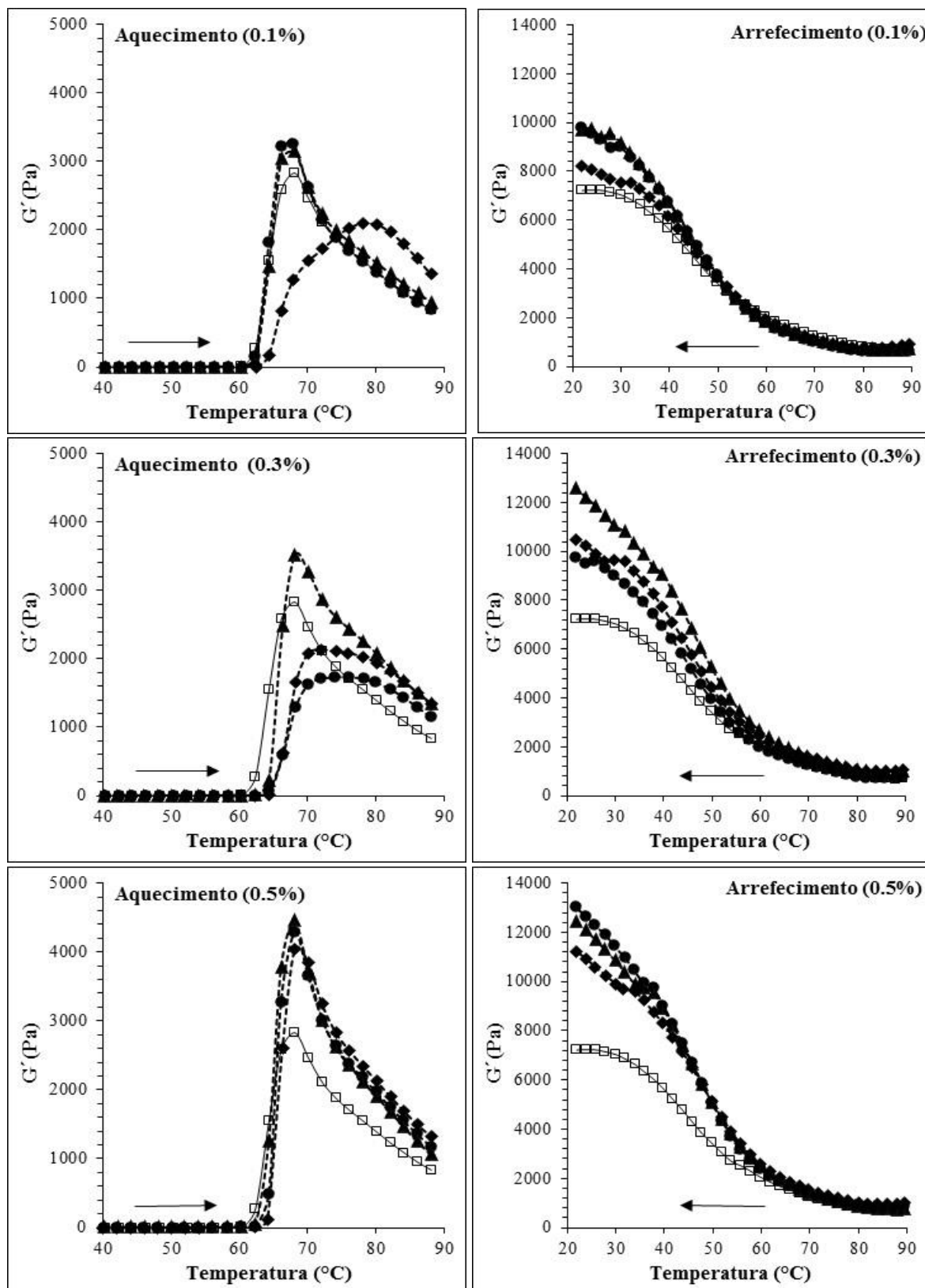
#### *4.3.2.1 Varrimento em Temperatura*

Durante as rampas de aquecimento e arrefecimento, analisou-se o comportamento viscoelástico dos sistemas amido/galactomanana em função da temperatura, a frequência e amplitude de deformação constantes, com o objetivo de avaliar a influência que a adição das galactomananas exerce no processo de gelatinização do amido (aquecimento de 40 a 90 °C) e também na estruturação que ocorre após este processo (arrefecimento de 90 a 20 °C).

As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam a evolução do módulo elástico ( $G'$ ) durante o ciclo de aquecimento e arrefecimento de suspensões aquosas dos amidos COM e MPA a 20% (m/m) em misturas com as galactomananas goma guar (GG), goma de alfarroba (GA) e goma cassia (GC) a 0.1, 0.3 e 0.5% de concentração (m/m). Estas figuras demonstram que quer no aquecimento quer no arrefecimento as curvas dos sistemas mistos, em geral, apresentam um perfil semelhante àquele dos sistemas compostos unicamente pelos amidos. Porém, a presença da galactomanana influencia determinados parâmetros reológicos, conforme será discutido, consoante a concentração e tipo de goma adicionada e também com diferenças entre as variedades de amido de milho utilizadas.



**Figura 4.1:** Curvas médias da evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da temperatura. Efeito da adição das galactomananas guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC) no amido COM em suspensão aquosa a 20% (m/m). Frequência de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . (■) controlo, (Δ) GG, (○) GA, (◇) GC



**Figura 4.2:** Curvas médias da evolução do módulo elástico ( $G'$ ) em função da temperatura. Efeito da adição das galactomananas guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC) no amido MPA em suspensão aquosa a 20% (m/m). Frequência de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1 °C/min. (□) controlo, (▲) GG, (●) GA, (◆) GC

Para complementar a discussão das curvas observadas nestas figuras, os parâmetros associados à variação das propriedades viscoelásticas, durante o aquecimento, são apresentados na Tabela 4.3 através dos valores obtidos com o módulo elástico. Estes valores demonstram a influência das galactomananas na temperatura de início do processo de gelatinização (TG), no ponto máximo da curva ( $G'_{\text{máx}}$ ) e na temperatura de pico (TP) correspondente ao  $G'_{\text{máx}}$  (parâmetros definidos no capítulo 2 item 2.3.9.1).

**Tabela 4.3:** Parâmetros obtidos com base na variação do módulo elástico, durante o ciclo de aquecimento, dos sistemas mistos dos amidos (MPA e COM) a 20% (m/m) e galactomananas: goma guar (GG), goma de alfarroba (GA), goma cassia (GC).

	TG (°C)		TP (°C)		$G'_{\text{máx}}$ (kPa)	
	MPA	COM	MPA	COM	MPA	COM
<b>Amidos 20%</b>	<b>59.3<sup>a</sup></b> ± 0.9	<b>58.4<sup>a</sup></b> ± 0.1	<b>67.2<sup>a</sup></b> ± 1.1	<b>70.1<sup>a</sup></b> ± 0.1	<b>2.8<sup>b</sup></b> ± 0.2	<b>7.0<sup>b</sup></b> ± 1.1
+ GG 0.1%	<b>60.5<sup>b</sup></b> ± 0.1	<b>60.6<sup>bc</sup></b> ± 0.1	<b>68.1<sup>ab</sup></b> ± 0.1	<b>70.1<sup>a</sup></b> ± 0.1	<b>3.2<sup>c</sup></b> ± 0.0	<b>6.8<sup>ab</sup></b> ± 1.1
+ GA 0.1%	<b>60.3<sup>b</sup></b> ± 0.0	<b>61.5<sup>cde</sup></b> ± 0.9	<b>68.1<sup>ab</sup></b> ± 0.1	<b>70.2<sup>a</sup></b> ± 0.0	<b>3.3<sup>c</sup></b> ± 0.2	<b>6.7<sup>ab</sup></b> ± 0.3
+ GC 0.1%	<b>62.7<sup>f</sup></b> ± 0.2	<b>60.4<sup>b</sup></b> ± 0.1	<b>79.5<sup>d</sup></b> ± 0.9	<b>70.2<sup>a</sup></b> ± 0.1	<b>2.1<sup>a</sup></b> ± 0.4	<b>6.9<sup>ab</sup></b> ± 0.5
+ GG 0.3%	<b>61.4<sup>de</sup></b> ± 0.3	<b>63.4<sup>g</sup></b> ± 0.0	<b>68.3<sup>ab</sup></b> ± 0.1	<b>76.3<sup>b</sup></b> ± 2.5	<b>3.5<sup>c</sup></b> ± 0.6	<b>6.3<sup>ab</sup></b> ± 0.6
+ GA 0.3%	<b>62.5<sup>f</sup></b> ± 0.1	<b>63.0<sup>g</sup></b> ± 1.1	<b>74.2<sup>c</sup></b> ± 2.5	<b>77.5<sup>b</sup></b> ± 1.2	<b>1.8<sup>a</sup></b> ± 0.0	<b>5.7<sup>a</sup></b> ± 0.4
+ GC 0.3%	<b>62.4<sup>f</sup></b> ± 0.2	<b>62.5<sup>f</sup></b> ± 0.4	<b>73.2<sup>c</sup></b> ± 1.1	<b>70.6<sup>a</sup></b> ± 1.0	<b>2.1<sup>a</sup></b> ± 0.0	<b>7.3<sup>bc</sup></b> ± 1.0
+ GG 0.5%	<b>60.8<sup>bc</sup></b> ± 0.5	<b>60.7<sup>bcd</sup></b> ± 0.2	<b>68.2<sup>ab</sup></b> ± 0.1	<b>70.3<sup>a</sup></b> ± 0.1	<b>4.5<sup>e</sup></b> ± 0.0	<b>8.5<sup>c</sup></b> ± 0.0
+ GA 0.5%	<b>61.2<sup>cd</sup></b> ± 0.2	<b>61.5<sup>de</sup></b> ± 0.6	<b>68.2<sup>ab</sup></b> ± 0.0	<b>70.2<sup>a</sup></b> ± 0.0	<b>4.3<sup>de</sup></b> ± 0.2	<b>7.4<sup>bc</sup></b> ± 0.2
+ GC 0.5%	<b>61.7<sup>c</sup></b> ± 0.1	<b>61.9<sup>ef</sup></b> ± 0.8	<b>69.2<sup>b</sup></b> ± 1.1	<b>70.3<sup>a</sup></b> ± 0.1	<b>4.1<sup>d</sup></b> ± 0.1	<b>7.2<sup>b</sup></b> ± 0.6

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

TG: temperatura inicial do processo de gelatinização, TP: temperatura de pico,  $G'_{\text{máx}}$ :  $G'$  máximo.

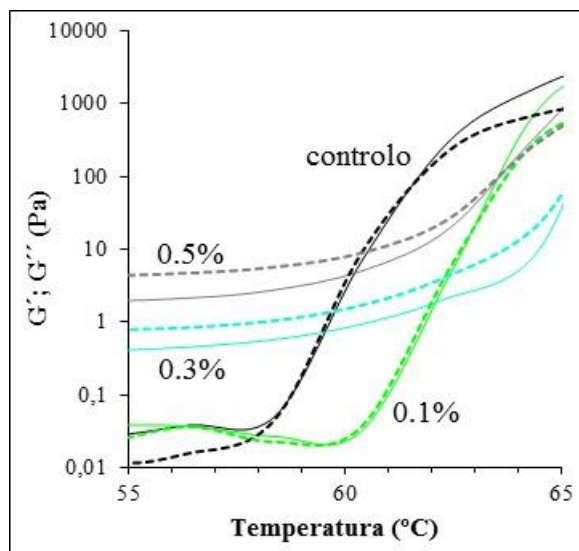
Em relação à temperatura de início do processo de gelatinização do amido (TG) foi observada a sua alteração mediante a adição das galactomananas (Tabela 4.3). Para

qualquer uma das concentrações de galactomananas testadas, a presença deste polissacarídeo aumentou a temperatura de gelatinização do sistema, de acordo com o critério utilizado, em relação ao observado para cada amido isoladamente. O maior aumento da TG verificou-se para 0.3% de galactomanana, mas para 0.5% foi já observada uma diminuição, comportamento este semelhante para ambos os amidos e para qualquer um dos tipos de galactomananas estudadas.

A elevação da TG dos amidos com a adição das gomas pode ser relacionada com os fatores discutidos anteriormente (item 3.3.2.1), ou seja, principalmente reflete a competição pela água quando um segundo componente é introduzido, havendo menos água livre para a gelatinização do amido, retardando principalmente o inchamento dos grânulos e a interação entre eles, sendo necessária uma temperatura mais elevada para que se inicie. Para além disto, a maior viscosidade que é conferida ao meio e que dificulta a mobilidade, o inchamento e a interação granular desempenhará também um papel importante. A TG diminuiu de 0.3% para 0.5% de galactomanana adicionada, e é de notar que o comportamento viscoelástico na vizinhança desta alteração é muito diferente do observado para 0.1% de galactomanana ou para o amido sozinho (Figura 4.3). Para estas misturas os módulos são muito superiores e  $G'' > G'$ , demonstrando um caráter viscoso mais pronunciado. A diminuição da TG, que ocorreu para 0.5% de galactomanana (comparado com 0.3%), pode traduzir uma separação de fases entre os dois polímeros e uma concentração de cada um na fase em que predominam, um efeito que favorece as interações nomeadamente entre amido, em oposição à maior limitação do acesso à água e taxa de inchamento. Pode ser uma indicação de que as gomas em maior concentração tiveram mais dificuldade em se espalhar de forma homogénea entre os grânulos de amido (permitindo um maior contato granular). Como forma de sustentar esta hipótese acrescenta-se que, durante os experimentos, também foi testada a adição de 1% das gomas. De fato, nesta concentração visualmente os sistemas mistos não formaram uma mistura homogénea (a qual foi visualmente obtida até 0.5%). Apesar desta observação, foi realizado um varrimento em temperatura utilizando-se 1% de goma (GA). Neste sistema misto a temperatura mais elevada para se atingir o momento crítico de aumento acentuado de  $G'$  foi atingida em 60.2 °C (mais baixa que a 0.5%). Esta análise suporta os resultados demonstrando que, no presente trabalho, a adição das galactomananas até 0.3% exerceu



um efeito de alterar a TG para temperaturas mais elevadas e em maiores concentrações (0.5 e 1%) a TG iniciou uma diminuição. Assim, pode-se inferir que quando as gomas foram adicionadas em proporção mais elevada, no caso a partir de 0.5%, ao haver uma maior interação grânulo-grânulo a TG foi alcançada para temperaturas inferiores.



**Figura 4.3:** Exemplo do comportamento viscoelástico no início do processo de gelatinização. Evolução do módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo viscoso ( $G''$ ) em função da temperatura. Efeito da adição da galactomanana guar (0.1, 0.3 e 0.5%) no amido COM em suspensão aquosa a 20% (m/m). Frequência de 2 rad/s, deformação de 1% e taxa de variação de temperatura de 1 °C/min.  $G'$  (—),  $G''$  (---).

Analisando-se a TG dentro da mesma gama de concentrações adicionadas de galactomananas e, portanto, em termos de suas diferentes estruturas que apresentam parâmetros deveras distintos quanto à razão  $M/G$  e  $Mv$  e que refletem na  $[\eta]$ , as mesmas observações feitas com relação à concentração podem ser consideradas. Entre as diferentes gomas a 0.3% observa-se (com exceção da GG no amido MPA) que a temperatura se altera na ordem:  $GG > GA > GC$ . Esta é uma resposta que seria de se esperar considerando que a GG apresenta a maior  $[\eta]$  (maior volume hidrodinâmico em solução) dificultando a interação granular do amido e consequentemente elevando mais a temperatura do início do processo de gelatinização. Entretanto, com a adição de 0.5% uma relação contrária quanto à TG foi obtida:  $GC > GA > GG$ . Seguindo a mesma linha de pensamento e as observações feitas anteriormente, se a 0.5% os sistemas mistos não ficaram completamente

homogêneos (mesmo não se tendo conseguido observar isto visualmente) a maior homogeneidade é esperada para a goma com menor  $[\eta]$ , ou seja a GC que, neste caso em relação as outras gomas, possivelmente conseguiu se espalhar melhor entre os grânulos de amido e assim elevou mais a TG.

Durante o aquecimento, o desenvolvimento acentuado de  $G'$  (relacionado com o inchamento irreversível dos grânulos de amido, com a lixiviação da amilose e consequentemente com o desenvolvimento da rede tridimensional formada pelos biopolímeros) pode ser avaliado através dos valores de  $G'_{\text{máx}}$  alcançados (Tabela 4.3). A adição das galactomananas a 0.1% praticamente não exerceu influência sobre o módulo elástico resultando em curvas similares às dos amidos isolados. Curiosamente, nesta concentração, a GC foi a única que alterou o perfil da curva, diminuindo o  $G'_{\text{máx}}$  com relação às outras gomas e também com relação ao controle. No entanto, este efeito só foi observado no sistema misto com o amido MPA. Consequentemente a TP (temperatura em que inicia o decréscimo de  $G'$  com o aumento da temperatura e que corresponderá, essencialmente, à rutura apreciável dos grânulos de amido) também foi alterada em função deste diferenciado perfil, aumentando em comparação com os outros sistemas. Para os sistemas mistos restantes a TP não foi influenciada pela adição das galactomananas demonstrando que quer nos sistemas compostos somente por amido quer nos sistemas mistos a mesma temperatura foi necessária para o início da rutura da estrutura granular do amido. Com a adição de 0.3% das galactomananas, apesar de pouco intensas, a maioria das curvas demonstraram diminuição no desenvolvimento de  $G'$  quando comparadas aos controles (provável efeito sobre a lixiviação da amilose). Este efeito negativo quanto ao inchamento granular e desenvolvimento da rede tridimensional, ocasionado pelas gomas com relação aos controles, foi observado quer com a adição da goma mais ramificada (GG) quer com as menos ramificadas (GA e GC) não se conseguindo observar alguma relação com a estrutura das galactomananas. Já com a adição de 0.5% as três galactomananas em estudo tendem a aumentar os valores de  $G'_{\text{máx}}$  quando comparados aos controles (pouco expressivo com a GC e GA no amido COM). O maior desenvolvimento de  $G'$  com 0.5% das galactomananas (que foi igualmente obtido no varrimento teste realizado com 1% da GA) também remete à diferença observada na TG com esta concentração. Esta resposta pode estar ligada à predominância de interações entre os

polímeros do mesmo tipo (amido-amido, goma-goma), fator este que permitiu o desenvolvimento de  $G'$  nestes sistemas mistos não inferior ao dos controlos, ocasionando um efeito positivo no desenvolvimento da rede polimérica formada nesta etapa do processo de gelatinização, ou seja, reforço da rede tridimensional com a presença das galactomananas. Nestes sistemas mistos, para ambos amidos, pode-se dizer que foi observada uma relação entre o  $G'_{\text{máx}}$  e a estrutura das galactomananas:  $GG > GA > GC$  (melhor desenvolvimento de  $G'$  com a diminuição da razão  $M/G$ , aumento da  $M_v$  e também da  $[\eta]$ ). Reforça-se que esta relação somente foi observada com 0.5% das gomas nos sistemas mistos.

Na literatura, varrimentos em temperatura através da reologia de oscilação utilizando-se sistemas mistos de amidos e galactomananas não são tão reportados quanto os varrimentos em frequência. Comparativamente pode-se citar o trabalho realizado por Kaur *et al.* (2008) que apresenta este varrimento em sistemas mistos utilizando diferentes amidos com a goma cassia (1, 2 e 5%). A preparação dos sistemas mistos foi realizada utilizando o amido e a goma misturados antes da hidratação para obter uma concentração final de 12%. Neste estudo os autores citam que a TG aumentou de acordo com a concentração da goma nos amidos de milho normal e modificado e no amido de batata, não sendo alterada no amido com alto teor de amilopectina (valores não apresentados). Os valores de  $G'_{\text{máx}}$  durante o ciclo de aquecimento variaram entre os amidos. Nos amidos de milho normal e com alto teor de amilopectina a goma a 1% alcançou os maiores valores de  $G'$  (superiores aos controlos) e depois foi diminuindo com o aumento das concentrações. No amido de batata quanto maior a concentração da goma menor o  $G'$  e no amido com alto teor de amilose houve a relação inversa (igualmente ao presente trabalho, ou seja, maior concentração de goma maior o  $G'_{\text{máx}}$ ). As diferenças foram atribuídas às estruturas granulares e inchamento ocorrido nos amidos. Quanto a varrimentos em temperatura em sistemas de amidos mistos com outros hidrocolóides pode-se acrescentar o trabalho de Santos *et al.* (2002) que observou em misturas de amido de trigo (20 e 50%) e pentosanas (0.2, 0.5 e 1%) o prorrogamento da TG e a diminuição de  $G'_{\text{máx}}$  com o aumento da concentração das pentosanas devido ao menor inchamento dos grânulos (de acordo com os nossos resultados com relação à TG, mas mostra um comportamento diferente quanto ao  $G'_{\text{máx}}$ ). Recentemente Chantaro *et al.* (2013) analisaram sistemas mistos de amido de

mandioca e goma xantana. Os autores não realizaram o varrimento em temperatura do amido sozinho e sim de misturas em diferentes proporções (amido/goma: 9.5/0.5, 9/1 e 8.5/1.5) constatando o aumento de  $G'_{\text{máx}}$  consoante o aumento da concentração da goma, resultado este que está de acordo com o que observamos.

Durante o arrefecimento observa-se o restabelecimento da estrutura e formação de uma rede tridimensional que ao final formará uma pasta ou gel. Quanto à temperatura na qual a estruturação da rede polimérica tornou-se intensa não houve alteração entre os controlos e os sistemas mistos (acentuada abaixo de 60 °C). Nota-se, através das figuras 4.1 e 4.2, que as galactomananas atuaram de maneira positiva no desenvolvimento de  $G'$  (aumento do módulo elástico) quando os sistemas mistos são comparados com os controlos (com dependência da concentração e tipo de goma para além da variedade do amido). As galactomananas demonstraram contribuir para a formação da rede polimérica, aumentando a sua rigidez que é traduzida pela melhor estruturação ocorrida com relação ao amido que foi gelatinizado em um sistema unicamente na presença de água. As diferenças entre a estruturação dos sistemas de amido e mistos com as galactomananas foram calculadas através da recuperação relativa da estrutura (RRE) definida através da equação 4.4.

$$\text{RRE} = (G'_{20\text{ °C}} - G'_{90\text{ °C}, 10\text{ min}}) / G'_{90\text{ °C}, 10\text{ min}} \quad (\text{equação 4.4})$$

O  $G'_{20\text{ °C}}$  representa o valor de  $G'$  obtido a 20 °C após o arrefecimento e o  $G'_{90\text{ °C}, 10\text{ min}}$  representa o valor de  $G'$  obtido após 10 min a 90 °C.

A Tabela 4.4 apresenta os valores da RRE para os sistemas controlos e mistos com as galactomananas. Através dos valores obtidos verifica-se que a recuperação relativa da estrutura durante o arrefecimento foi influenciada pelas galactomananas. Com relação aos controlos os valores aumentaram para a maioria dos sistemas mistos demonstrando que a RRE ocorreu em maior extensão comparada aos sistemas compostos pelos amidos gelatinizados isoladamente. A recuperação da estrutura (RRE) bem como os valores finais de  $G'$  a 20 °C obtidos para os sistemas mistos apresentam uma correlação com os componentes intragranulares lixiviados dos amidos (sistemas que obtiveram os maiores valores de  $G'_{\text{máx}}$  também resultaram em maior REE).

**Tabela 4.4:** Recuperação relativa da estrutura (RRE), durante o arrefecimento, dos sistemas mistos dos amidos (MPA e COM) a 20% (m/m) e galactomananas: goma guar (GG), goma de alfarroba (GA), goma cassia (GC).

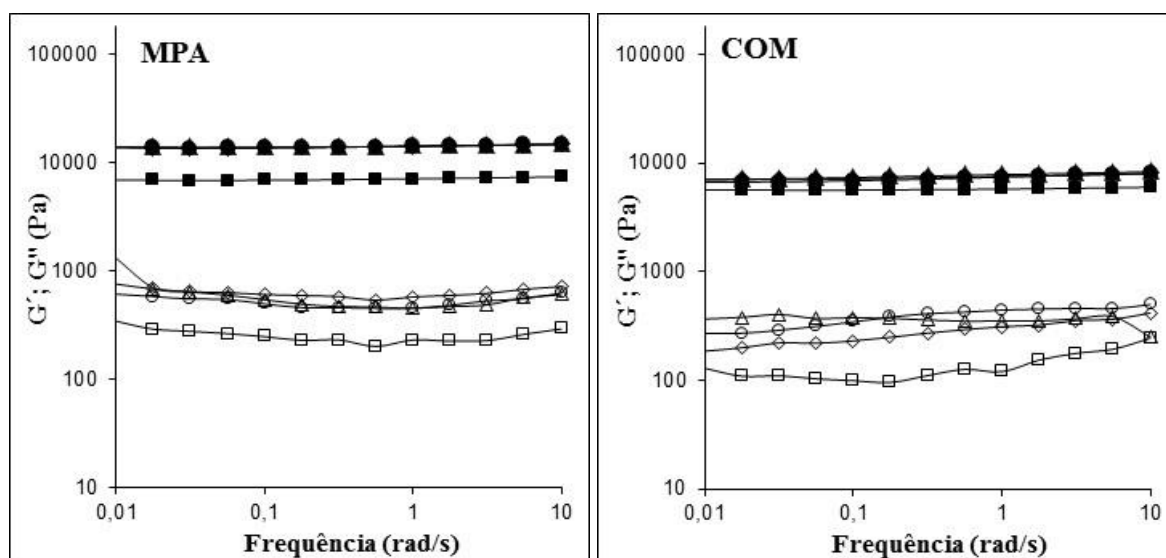
RRE (%)		
	MPA	COM
<b>Amidos 20%</b>	<b>954<sup>ab</sup> ± 108</b>	<b>307<sup>bcd</sup> ± 34</b>
+ GG 0.1%	1295 <sup>cde</sup> ± 62	379 <sup>d</sup> ± 4
+ GA 0.1%	1490 <sup>ef</sup> ± 20	326 <sup>bcd</sup> ± 24
+ GC 0.1%	865 <sup>a</sup> ± 449	359 <sup>cd</sup> ± 6
+ GG 0.3%	1161 <sup>bcd</sup> ± 60	259 <sup>b</sup> ± 36
+ GA 0.3%	1183 <sup>bcd</sup> ± 60	241 <sup>a</sup> ± 9
+ GC 0.3%	926 <sup>ab</sup> ± 115	296 <sup>bc</sup> ± 119
+ GG 0.5%	1582 <sup>f</sup> ± 25	301 <sup>bc</sup> ± 9
+ GA 0.5%	1444 <sup>def</sup> ± 142	320 <sup>bcd</sup> ± 2
+ GC 0.5%	1042 <sup>abc</sup> ± 44	343 <sup>cd</sup> ± 8

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

Comparando-se a influência das diferentes galactomananas na estruturação da rede polimérica (REE), os valores são menores para a GC nas três concentrações utilizadas nas misturas com o amido MPA (sem diferença significativa do controlo). Com este amido a estruturação dos sistemas mistos foi mais intensa quando comparada aos sistemas mistos com o amido COM, os quais apresentaram pouca diferença quer entre as gomas quer em relação ao controlo. Estes resultados demonstram que a formação de rede entre os biopolímeros foi também dependente da variedade do amido utilizado (provavelmente envolvendo diferenças estruturais como no comprimento e distribuição das cadeias dos componentes do amido). O maior desenvolvimento de  $G'$ , no ciclo de arrefecimento, com a adição das galactomananas está de acordo com o observado por Kaur *et al.* (2008). O sistema misto do amido COM + GA 0.3% foi o único que apresentou uma estruturação significativamente inferior resultando, neste caso, em menor  $G'$  quando comparado com o controlo (observada somente com o amido COM). Não se conseguiu perceber o porquê deste comportamento ter ocorrido com a GA nesta concentração e com este amido.

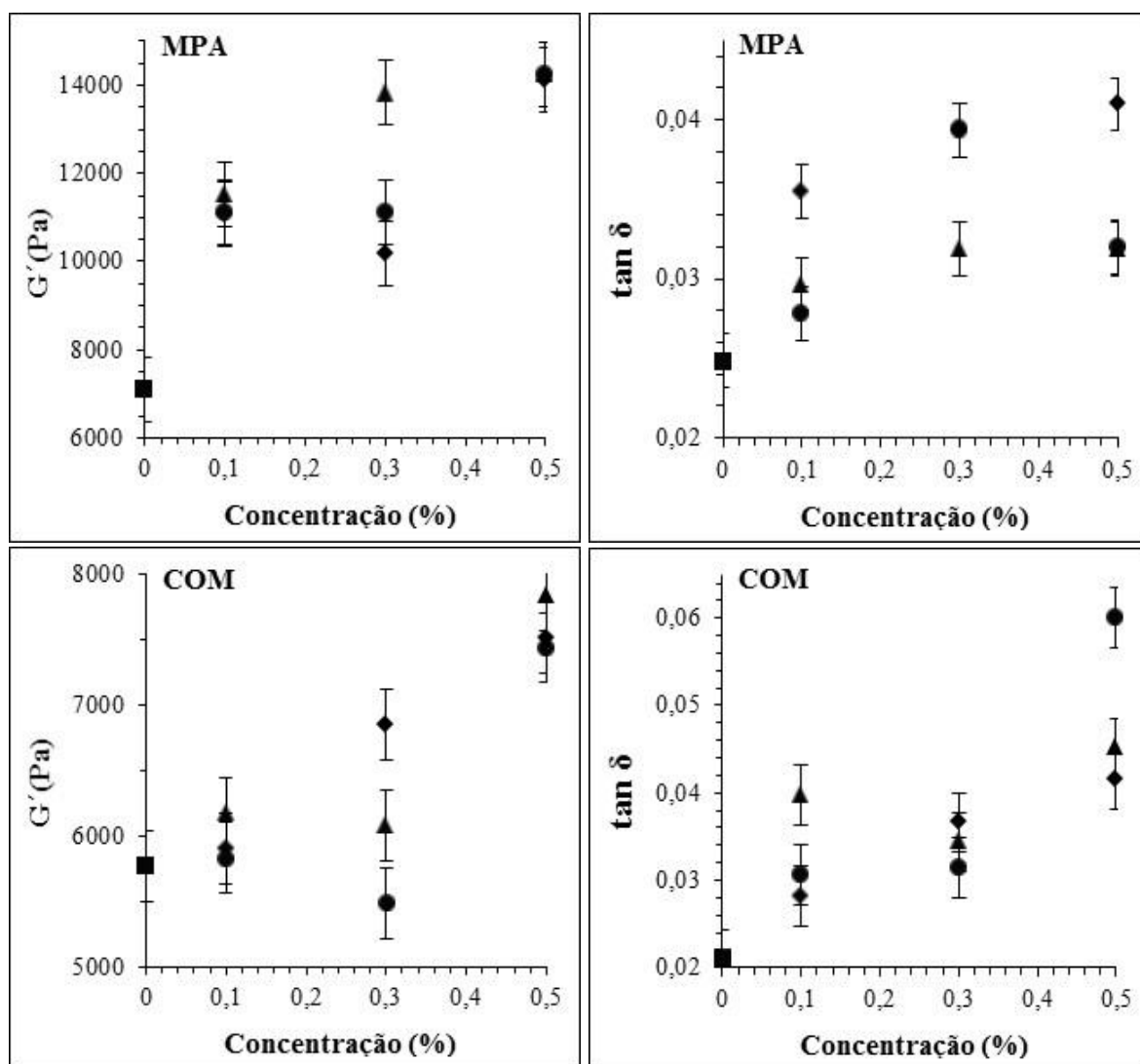
#### 4.3.2.2 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos

A Figura 4.4 apresenta os espectros mecânicos do amido gelatinizado na presença das galactomananas a 0.5% de concentração. Esta figura exemplifica, através da variação de ambos os módulos ( $G'$  e  $G''$ ) em função da frequência de oscilação, o efeito ocasionado pela presença das galactomananas no comportamento viscoelástico a 20 °C dos sistemas gelificados, após a rampa de arrefecimento *in situ* no reômetro. Em termos qualitativos o comportamento viscoelástico é semelhante quer para o amido isolado quer para as misturas com as galactomananas. Em geral, a presença das galactomananas levou ao aumento de ambos os módulos viscoelásticos, efeito mais evidente para as misturas com o amido MPA. Os espectros mecânicos demonstram que, igualmente aos sistemas de amido, os sistemas mistos apresentam  $G'$  significativamente superior ao  $G''$  e praticamente independentes da frequência de oscilação durante toda a gama utilizada nos ensaios (sem diferença na mobilidade molecular). Este resultado caracteriza os sistemas mistos de amido e galactomananas em estudo como géis bem estruturados e com comportamento sólido-elástico.



**Figura 4.4:** Médias dos espectros mecânicos após o varrimento em temperatura. Efeito da adição de 0.5% de galactomananas, guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC) ao amido a 20% em água (m/m). (20 °C, 1% de deformação) Símbolos fechados:  $G'$ , símbolos abertos:  $G''$ . (■ □) controlo, (▲ Δ) GG, (● ○) GA, (◆ ◇) GC

Atendendo à reduzida dependência dos módulos relativamente à frequência e para uma mais fácil visualização do efeito da concentração de galactomanana adicionada, na Figura 4.5 é apresentada a variação de  $G'$  e da  $\tan \delta$  em função da concentração das galactomananas adicionadas aos amidos para uma frequência intermédia de 1 rad/s. A  $\tan \delta$  traduz o observado nos espectros mecânicos confirmando que o comportamento dos géis é predominantemente elástico com os valores da tangente de perda inferiores à unidade em todo o experimento.



**Figura 4.5:** Variação do módulo elástico ( $G'$ ) e da  $\tan \delta$  em função da concentração de galactomananas, nos géis de amido a 20% (m/m) a frequência de 1 rad/s, após varrimento em temperatura. (20 °C, 1% de deformação).

(■) controlo, (▲) GG, (●) GA, (◆) GC

Como é possível observar, com a adição das galactomananas ocorreu a elevação de  $G'$  em relação aos controlos indicando efeito sinérgico nas propriedades elásticas. Através da  $\tan \delta$  verifica-se também que a viscoelasticidade dos géis dos amidos foi modificada pelas galactomananas, com dependência da concentração, sendo esta alteração um pouco mais pronunciada nas misturas para o amido COM. Para todos os géis de amido mistos com as galactomananas, em relação aos respetivos controlos, houve aumento da  $\tan \delta$  com a adição das gomas demonstrando aumento do carácter viscoso e, conseqüentemente, denota a formação de géis que são menos rígidos e/ou mais fracos do que o gel constituído unicamente por amido. Quanto à avaliação sobre a estrutura das gomas não conseguiu-se observar uma relação linear quanto à alteração na viscoelasticidade dos amidos (com o amido MPA a GC aumentou mais o carácter viscoso e com o amido COM ocorreu o contrário).

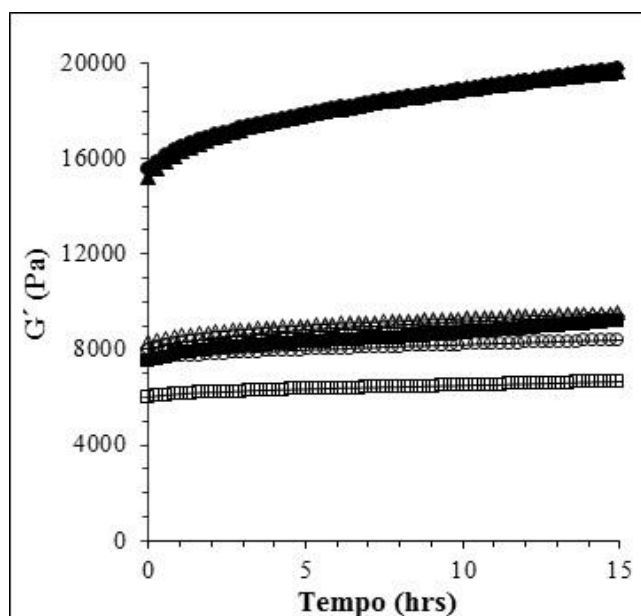
Este aumento do carácter viscoso que foi observado devido à introdução de galactomananas em sistemas de amido é um efeito bastante comum de ocorrer (Ahmad e Williams, 2001; Yoo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Choi e Yoo, 2008; Kaur *et al.*, 2008; Achayuthakan e Supphantharika, 2008; Rosell *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013), entretanto, em alguns tipos de misturas destes biopolímeros é verificado o aumento do carácter elástico (diminuição da  $\tan \delta$ ) e, portanto, a formação de estruturas mais rígidas (Chaisawang e Supphantharika, 2005, 2006; Arocas *et al.*, 2009). Assim, o aumento de  $G'$  e também da  $\tan \delta$  estão de acordo com outras pesquisas realizadas utilizando diferentes amidos adicionados das gomas guar e de alfarroba. Esta modificação nas propriedades reológicas dos amidos tem sido associada à incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros e determinada pelas características estruturais das gomas e dos amidos e, como verificamos, também influenciada pela concentração (as gomas diminuem a agregação do amido resultando na redução da elasticidade em geral e aumento das propriedades viscosas) (Yoo *et al.*, 2005; Choi e Yoo, 2008).

### 4.3.2.3 Varrimento em Tempo – Maturação

Este varrimento foi realizado para comparar a evolução dos géis de amido com a dos géis mistos com as galactomananas (GG, GA e GC), durante a maturação realizada no



período de 15 horas a 20 °C. A evolução das curvas de maturação dos géis foram diferenciadas entre os amidos, com maior desenvolvimento para o amido MPA, e seguiram o comportamento comumente observado em biopolímeros no qual inicialmente é verificada uma elevação no módulo elástico ( $G'$ ), que está relacionada à estruturação do gel (agregação da amilose) (Ahmad e Williams, 2001), seguida de uma variação menos intensa mas que continuou até o final do período de maturação em todos os géis. A não estabilização dos valores de  $G'$ , ou seja o não alcance do plateau, indica que rearranjos moleculares estão ocorrendo (mais ou menos intensos). A Figura 4.6 exemplifica a evolução de  $G'$  resultante da maturação dos géis de amido e mistos com as galactomananas.



**Figura 4.6:** Variação do módulo elástico ( $G'$ ) em função do tempo. Maturação dos géis de amido a 20% (m/m) e géis mistos com as galactomananas a 0.5%. Símbolos abertos: amido COM. Símbolos fechados: amido MPA.

(■ □) controlo, (▲ Δ) GG, (● ○) GA, (◆ ◇) GC

Para comparar as diferenças ocorridas no desenvolvimento do módulo elástico ( $G'$ ) foi utilizada a equação 4.6 através da qual se obtém a estruturação relativa durante a maturação (ERM). Calculou-se a ERM após um período arbitrário de 5 horas, como

representativo da estruturação inicial, e após o período de 15 horas (período total da maturação avaliado). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.5.

$$\text{ERM} = (G'_{5 \text{ ou } 15h} - G'_{\text{inicial}}) / G'_{\text{inicial}} \quad (\text{equação 4.6})$$

O  $G'_{\text{inicial}}$  representa o valor de  $G'$  obtido no início da maturação e o  $G'_{5 \text{ ou } 15h}$  representa o valor de  $G'$  obtido após a maturação durante 5 e 15 horas, respetivamente.

**Tabela 4.5:** Estruturação relativa durante a maturação (ERM), após o período de 5 e 15 horas, dos géis mistos de amido (MPA e COM) e géis mistos com as galactomananas: goma guar (GG), goma de alfarroba (GA), goma cassia (GC).

ERM (%)				
	5 horas		15 horas	
	MPA	COM	MPA	COM
<b>Amidos 20%</b>	<b>10.2<sup>a</sup> ± 0.7</b>	<b>5.7<sup>ab</sup> ± 2.9</b>	<b>23.0<sup>b</sup> ± 0.1</b>	<b>11.1<sup>bc</sup> ± 3.8</b>
+ GG 0.1%	16.1 <sup>b</sup> ± 0.1	6.3 <sup>abc</sup> ± 2.8	27.3 <sup>cd</sup> ± 0.0	10.9 <sup>bc</sup> ± 3.9
+ GA 0.1%	12.7 <sup>ab</sup> ± 3.3	5.5 <sup>abc</sup> ± 3.4	17.2 <sup>ab</sup> ± 12.1	9.9 <sup>bc</sup> ± 5.2
+ GC 0.1%	8.6 <sup>a</sup> ± 4.5	6.5 <sup>abc</sup> ± 2.3	17.5 <sup>ab</sup> ± 8.7	3.3 <sup>b</sup> ± 4.8
+ GG 0.3%	16.9 <sup>b</sup> ± 0.3	3.3 <sup>ab</sup> ± 1.2	28.9 <sup>d</sup> ± 0.7	8.3 <sup>b</sup> ± 0.5
+ GA 0.3%	9.8 <sup>a</sup> ± 0.6	2.1 <sup>a</sup> ± 0.1	18.9 <sup>a</sup> ± 1.5	6.2 <sup>b</sup> ± 1.6
+ GC 0.3%	15.4 <sup>b</sup> ± 0.5	2.9 <sup>ab</sup> ± 2.4	26.9 <sup>cd</sup> ± 0.3	8.3 <sup>bc</sup> ± 12.8
+ GG 0.5%	13.0 <sup>ab</sup> ± 3.6	8.3 <sup>bc</sup> ± 0.9	25.0 <sup>abcd</sup> ± 4.8	14.9 <sup>c</sup> ± 1.2
+ GA 0.5%	14.9 <sup>b</sup> ± 1.2	5.2 <sup>abc</sup> ± 4.6	27.6 <sup>cd</sup> ± 1.5	10.9 <sup>b</sup> ± 6.1
+ GC 0.5%	15.2 <sup>b</sup> ± 1.0	10.5 <sup>c</sup> ± 0.3	28.2 <sup>d</sup> ± 0.8	18.1 <sup>d</sup> ± 0.6

Correspondem à média de três valores ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa considerando  $p \leq 0.05$ .

De acordo com os valores obtidos, observa-se que ao final deste período, a adição das galactomananas alterou a rigidez dos géis de amido. Com algumas exceções, a elevação de  $G'$  para os géis mistos foi superior à evolução dos controlos, ou seja, esta resposta indica que as galactomananas, em geral, auxiliaram no desenvolvimento dos géis.

Nas horas iniciais da maturação (5 hrs) os valores da ERM aumentaram para os géis mistos apresentando diferença significativa dos controlos no caso dos géis elaborados com o amido MPA. Para 0.5% das gomas a tendência do aumento do  $G'$  foi: GC > GA >

GG, embora as diferenças entre as galactomananas não sejam estatisticamente significativas. Com o amido COM não foi observada a aceleração da gelificação. A menor evolução resultante dos géis mistos com o amido COM demonstra que a reorganização molecular do amido, em curto prazo ou nas horas seguidas ao processo de gelatinização, ocorreu em menor extensão quando comparada aos géis mistos do outro amido.

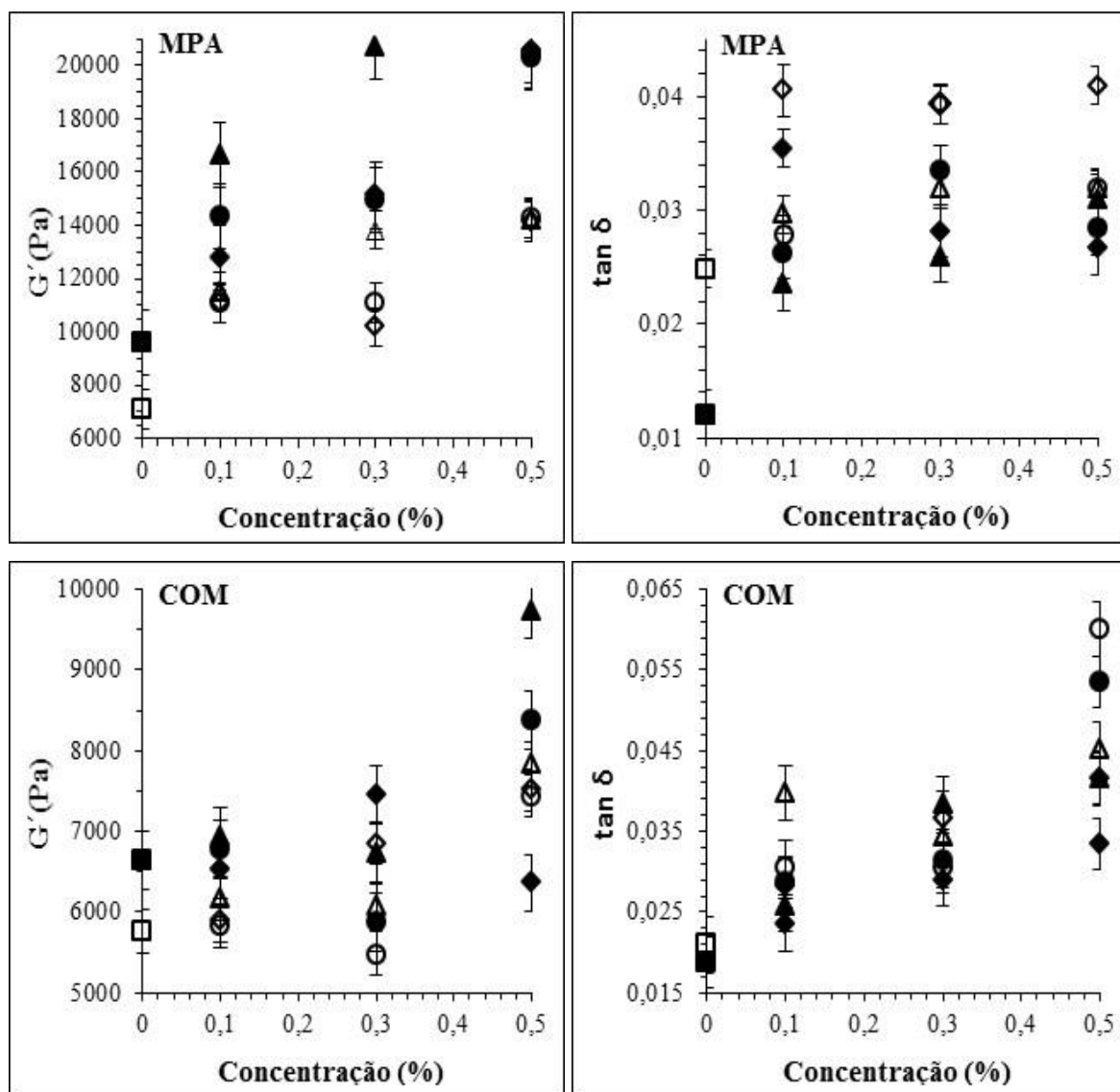
Ao final das 15 horas de maturação o aumento dos valores de  $G'$  também foi observado para a maioria dos géis mistos. Para os géis do amido MPA houveram diferenças a partir de 0.3% enquanto para o amido COM a partir de 0.5% das gomas. Igualmente ao observado após 5 horas de maturação, ao término das 15 horas os géis que mais desenvolveram foram com a presença da GC, entretanto as diferenças entre as três gomas utilizadas não foram expressivas. Pode-se entender, através destes resultados, que as galactomananas podem auxiliar na aceleração da gelificação e que também podem ocasionar maior desenvolvimento do gel (maior extensão da retrogradação ou reorganização molecular a curto prazo), não havendo grande diferença entre as três gomas (a GC foi significativamente diferente somente a 0.5% com o amido COM).

Comparando-se os resultados com a literatura, Kim *et al.* (2006) realizaram o varrimento de maturação de misturas de amido de arroz (5%) com as galactomananas guar e alfarroba (0.2, 0.4, 0.6 e 0.8%) durante o período de 10 horas a 4 °C. Ao término da análise os autores observaram aumento do módulo elástico com o aumento da concentração das gomas (superior aos controles com exceção da guar a 0.2%). Porém, nestes sistemas as gomas atuaram de maneira diferenciada. Nas primeiras horas de maturação ambas as gomas atuaram de maneira similar apresentando o rápido aumento de  $G'$ . Entretanto, após 5 horas do ensaio, a goma de alfarroba continuou apresentando aumento do módulo ao passo que com a goma guar o desenvolvimento foi aproximadamente constante. Com estas observações os autores concluem que com a goma guar o amido gelificou em menor período de tempo e com a alfarroba os rearranjos moleculares continuaram e a formação do gel foi mais lenta, porém alcançando maiores valores de  $G'$  (maior desenvolvimento do gel). As diferentes respostas obtidas durante a maturação foram correlacionadas com a menor proporção de galactose na alfarroba, ou seja, mais manose com regiões “lisas” que apresentaram a tendência em associarem-se e

ajudaram na formação da rede tridimensional. O aumento mais intenso das propriedades elásticas nas primeiras horas de maturação foi atribuído à menor mobilidade da amilose na presença das gomas e interação mais fácil e mais rápida (efeito de acelerar a formação do gel). Estes resultados podem ser correlacionados com os obtidos no presente trabalho. Kaur *et al.* (2008) analisaram a maturação de sistemas mistos de diferentes amidos com 2% de goma cassia durante 14 horas a 4 °C. De acordo com os autores o aumento do módulo elástico foi menos pronunciado que nos controlos, indicando que a goma atrasou o processo de retrogradação da amilose. Nagano *et al.* (2008) em sistemas mistos de amido de milho (5%) e goma guar (0.1, 0.3, 0.5 e 0.8%) realizaram a maturação dos géis durante 2 horas e observaram que aumentando a concentração da goma os valores de  $G'$  iniciais são dependentes da concentração, entretanto a goma inibiu o rápido aumento do módulo, resultado este que foi interpretado pela redução da lixiviação da amilose.

#### **4.3.2.4 Varrimento em Frequência de Oscilação – Espectros Mecânicos**

A Figura 4.7 apresenta o módulo elástico ( $G'$ ) e a  $\tan \delta$  em função da concentração das galactomananas adicionadas aos amidos, medidos a 1 rad/s. Esta figura compara o varrimento em frequência de oscilação realizado após o varrimento em temperatura e após a maturação. Os espectros mecânicos foram similares em ambos os varrimentos observando-se a alteração de  $G'$  para valores um pouco mais elevados após a maturação (relacionada à estruturação dos géis durante o período de maturação). Quanto à alteração da viscoelasticidade dos géis após o período de maturação, analisada através da  $\tan \delta$  ( $= G''/G'$ ), verificou-se que não foi significativamente alterada após este período de 15 horas de maturação. Os valores da  $\tan \delta$  diminuíram (aumento do carácter elástico) mas não expressivamente, sendo assim a viscoelasticidade dos géis similar antes e após o período de maturação. Kim *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes ao comparar os espectros mecânicos antes e após a maturação durante 10 horas em sistemas de amido com a goma guar e de alfarroba.



**Figura 4.7:** Variação do módulo elástico ( $G'$ ) e da  $\tan \delta$  em função da concentração de galactomananas, nos géis de amido a 20% (m/m) a frequência de 1 rad/s. Símbolos abertos: antes da maturação. Símbolos fechados: após a maturação. (20 °C, 1% de deformação). (■ □) controlo, (▲ △) GG, (● ○) GA, (◆ ◇) GC

### 4.3.3 Análises Microscópicas

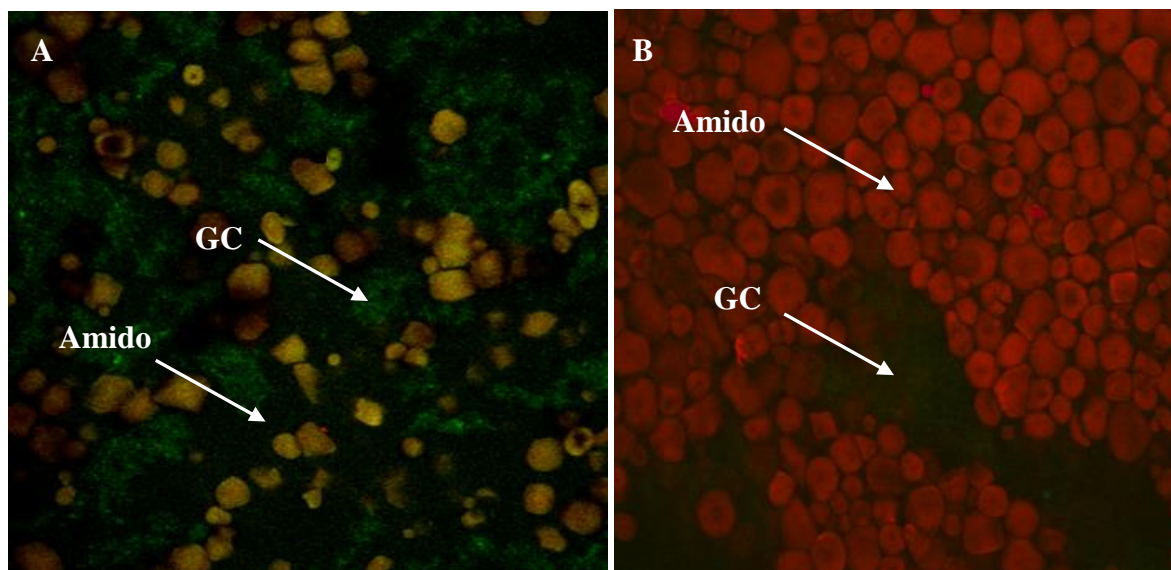
Neste capítulo foram utilizadas diferentes técnicas para analisar a microestrutura dos sistemas mistos de amido e galactomananas, nomeadamente a microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM) e a microscopia eletrónica de varrimento (MEV), esta última já foi utilizada nos capítulos anteriores. A CLSM foi utilizada nesta parte do trabalho para analisar a estrutura dos sistemas mistos, numa tentativa de melhor compreender o

comportamento destes sistemas e como a microestrutura do géis obtidos se relaciona com o comportamento reológico dos mesmos. A CLSM utiliza a detecção por fluorescência e no caso de misturas de distintos biopolímeros, a marcação dos diferentes componentes com fluorocromos distintos pode permitir obter informações acerca da distribuição de cada um deles no sistema, nomeadamente concluir se ocorre ou não separação de fases entre os biopolímeros em estudo.

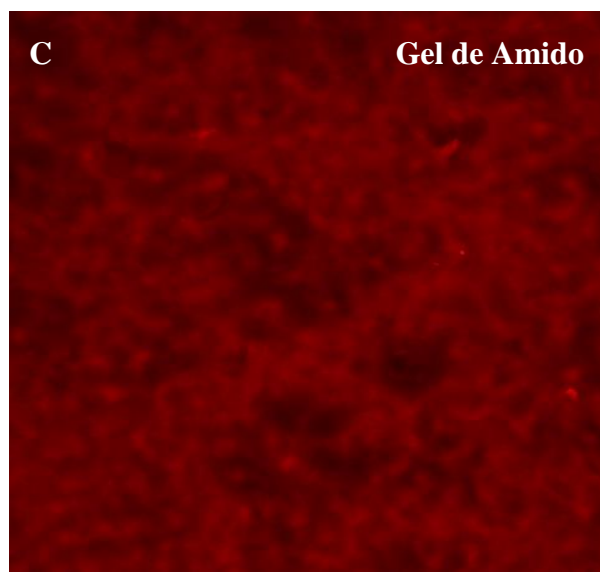
#### *4.3.3.1 Microscopia Confocal de Varrimento a Laser (CLSM)*

Para a visualização microscópica dos sistemas mistos antes do processo de gelatinização foi selecionado o amido COM (20%) adicionado da goma cassia (0.1 e 0.5%). Para a análise dos géis utilizou-se como controlo o amido COM (20%) e para os géis mistos foram selecionadas a GC e a GG (menos e mais ramificadas respetivamente) na menor e maior concentração utilizadas nas misturas (0.1 e 0.5%). Para comparação também foram obtidas micrografias dos géis mistos do amido MPA com a GC.

A Figura 4.8 apresenta as imagens obtidas por CLSM dos sistemas mistos antes do processo de gelatinização (A e B) e do gel de amido (C) a 20% de concentração. Em vermelho está corado o amido e em verde a galactomanana.



**Figura 4.8:** Imagens obtidas através da CLSM. A: suspensão de amido 20% + GC 0.1%. B: suspensão de amido 20% + GC 0.5%. C: gel de amido COM 20% (m/m).



**Figura 4.8 (continuação):** Imagens obtidas através da CLSM. A: suspensão de amido 20% + GC 0.1%. B: suspensão de amido 20% + GC 0.5%. C: gel de amido COM 20% (m/m).

Apesar de nas imagens A e B os polímeros não terem ficado efetivamente marcados para a emissão da fluorescência (na imagem A o amido e na B a GC), é possível observar a estrutura granular do amido antes da gelatinização, assim como a goma que está dispersa no meio aquoso. Em um primeiro momento, tentou-se associar estas imagens com o observado na reologia quanto à alteração da temperatura inicial do processo de gelatinização do amido (elevação da TG quando as galactomananas foram adicionadas ao amido e início de uma diminuição com 0.5% quando comparada com 0.3% das gomas). Observa-se que com a adição de 0.1% a goma demonstra se espalhar bem entre os grânulos de amido e desta maneira compete pela água disponível no sistema ocasionando a elevação da TG. A mesma competição ocorre quando 0.5% das gomas são adicionadas. Entretanto, como sugerido ao avaliar a TG através das análises reológicas, o início de sua diminuição acima de 0.5% de concentração, de fato, aparenta demonstrar uma relação com uma maior dificuldade da galactomanana em estar homogêneamente entre os grânulos de amido (pelo aumento de sua viscosidade em maior concentração), permitindo que estes fiquem mais aglomerados e em contato uns com os outros. Desta forma a TG inicia uma diminuição pela condição de empacotamento alcançada para menor temperatura. Comparativamente quanto à visualização dos grânulos de amido antes de serem gelatinizados, pode-se citar o trabalho realizado por Schirmer *et al.* (2013). Estes autores utilizaram a CLSM para

observar diferentes tipos de amido antes e após a gelatinização em suspensão aquosa e a micrografia do amido de milho é similar a do presente trabalho, com os grânulos completamente corados. Quanto a trabalhos com micrografias de CLSM em sistemas mistos com amido antes do processo de gelatinização, nenhum foi encontrado.

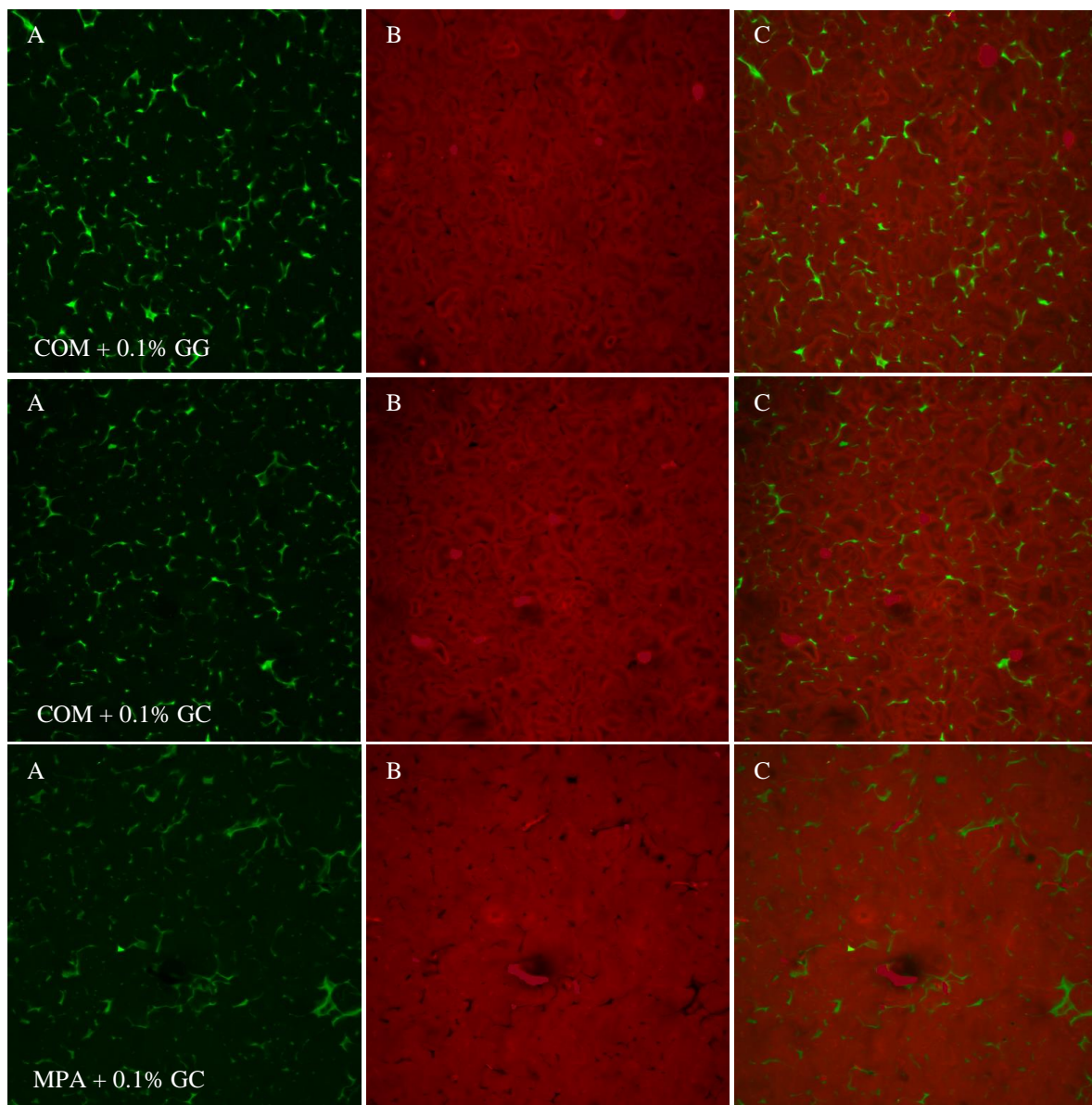
Na imagem C observa-se o gel de amido. O gel de amido, obtido após o ciclo de aquecimento e arrefecimento, pode ser considerado como uma estrutura que apresenta grânulos hidratados e cadeias de amilopectina incorporadas em uma matriz contínua de moléculas agregadas de amilose (Ahmad e Willians, 1998). Nesta imagem observa-se que a forma granular do amido já não se mantém e o gel é visualizado como uma microestrutura interligada e homogênea.

As Figuras 4.9.1 e 4.9.2 apresentam as imagens obtidas por CLSM dos géis de amido mistos com as galactomananas a 0.1 e 0.5% de concentração, respetivamente. Nas imagens representadas pela letra A é observada a fluorescência emitida somente pelas galactomananas (verde) e nas imagens representadas pela letra B é observada a fluorescência emitida somente pelo gel de amido (vermelho). A sobreposição de ambas fluorescências, na qual se observa junto as galactomananas e o amido gelatinizado, é visualizada nas figuras com a letra C (alguns pontos com coloração vermelha diferenciada devem-se a excesso localizado de corante).

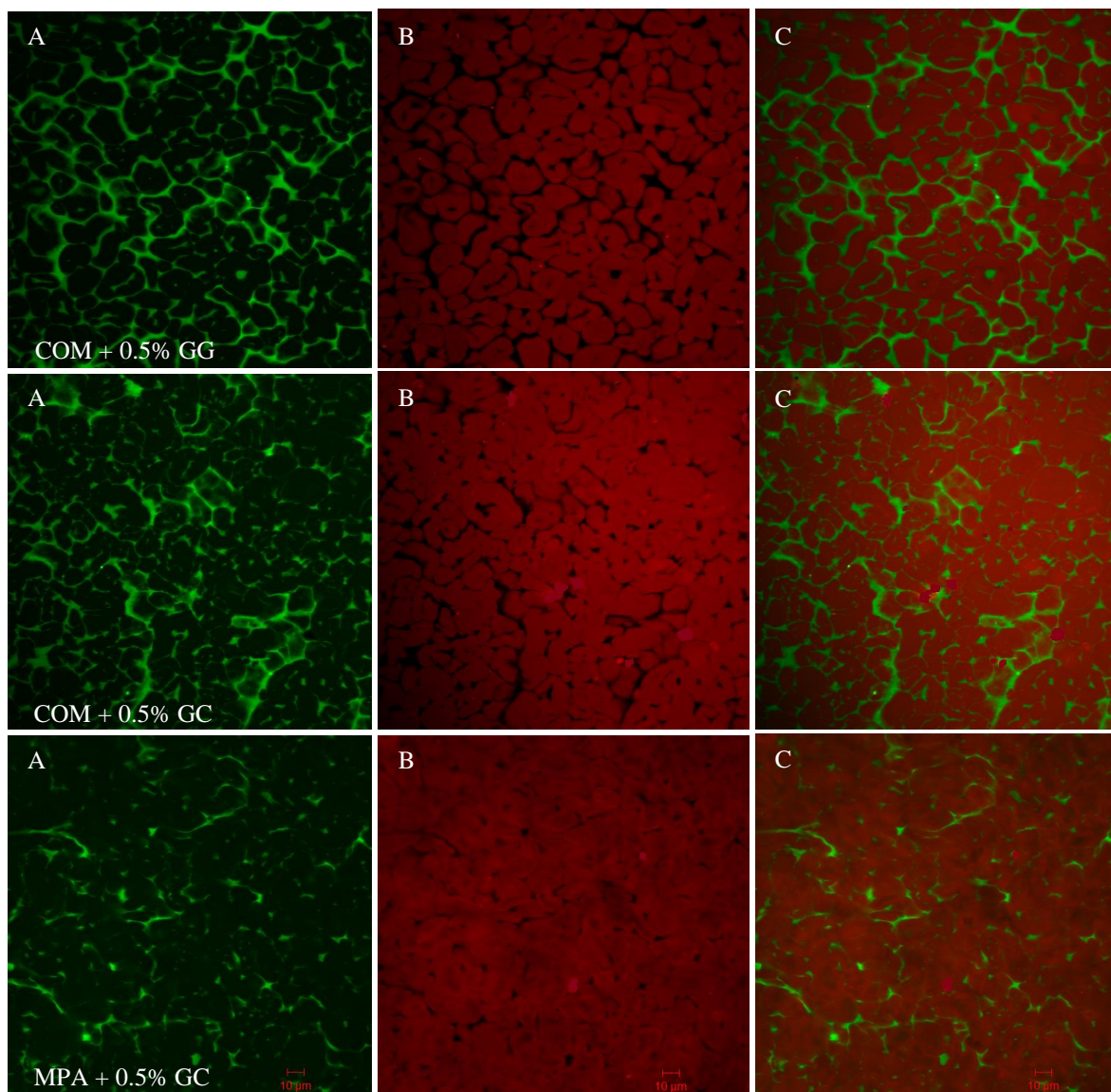
É notória em todos os géis mistos a presença das gomas, com dependência da concentração, que altera a morfologia das microestruturas (Figuras 4.9.1 e 4.9.2). Observa-se que são formadas duas fases sendo que a goma se encontra dispersa na fase predominante formada pelo gel de amido (sistema não homogêneo). As microestruturas demonstram que as galactomananas apresentam-se entre o gel de amido que, como referido anteriormente, perdeu a forma granular e apresenta estruturas disformes. A adição das galactomananas ocasionou uma descontinuidade entre as cadeias de amido nos géis (fator que provavelmente está relacionado com as diferenças observadas na reologia com relação ao aumento do caráter viscoso, observado através da  $\tan \delta$ ). Obviamente que este efeito é menor com 0.1% das gomas e nestes géis mistos a microestrutura observada ainda apresenta similaridade à do amido gelatinizado sem a presença das galactomananas. Com



0.5% observa-se uma perceptível alteração na microestrutura demonstrando que as gomas tiveram grande efeito em impedir a conectividade entre o amido gelatinizado.



**Figura 4.9.1:** Imagens de CLSM para os géis de amido (20%) mistos com a goma guar (GG) e goma cassia (GC) a 0.1% de concentração. A: fluorescência emitida pelas galactomananas. B: fluorescência emitida pelo amido. C: sobreposição de ambas fluorescências (galactomananas e amido).



**Figura 4.9.2:** Imagens de CLSM para os géis de amido (20%) mistos com a goma guar (GG) e goma cassia (GC) a 0.5% de concentração. A: fluorescência emitida pelas galactomananas. B: fluorescência emitida pelo amido. C: sobreposição de ambas fluorescências (galactomananas e amido).

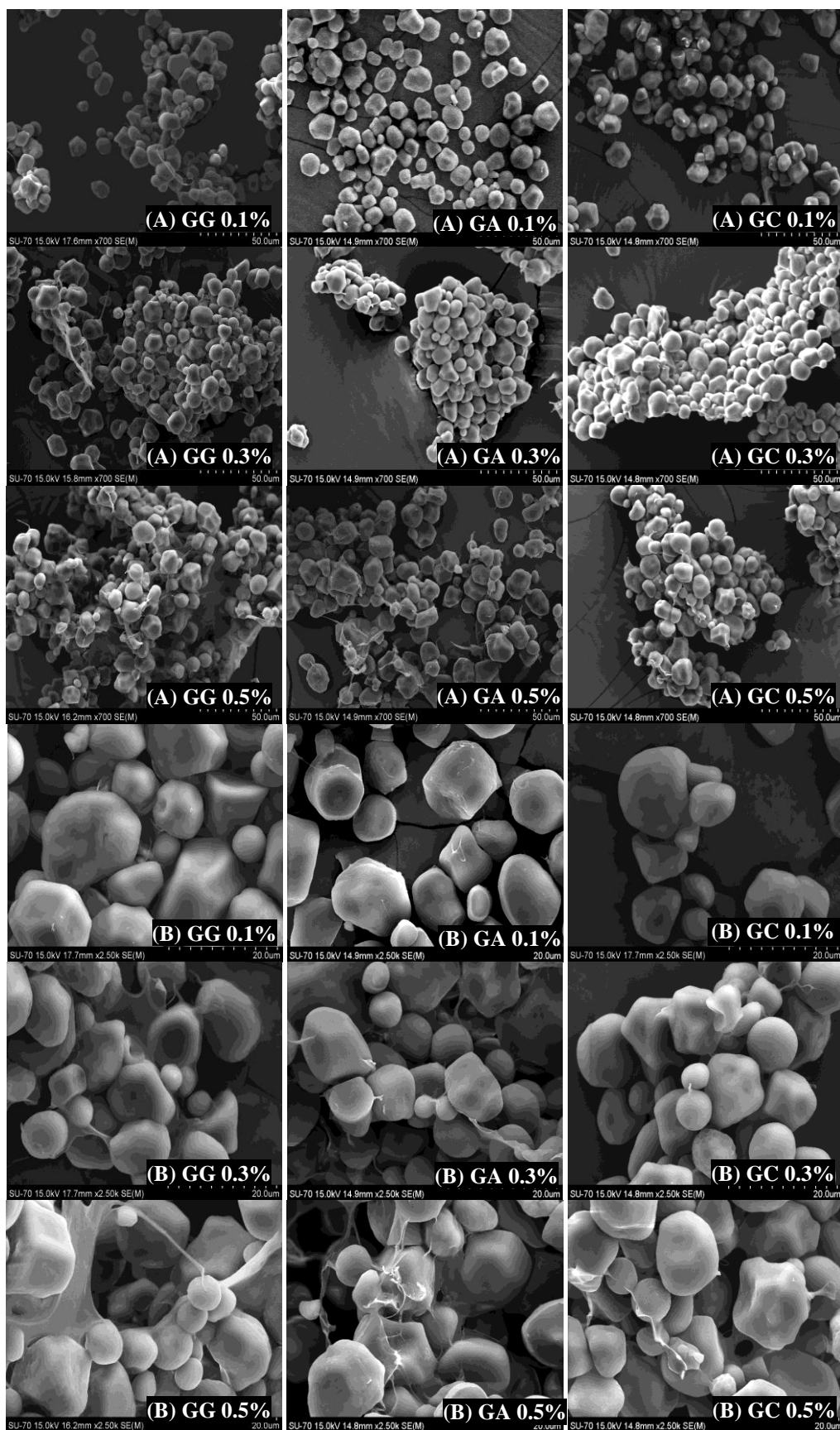
Comparando-se os géis mistos em termos das diferentes galactomananas (guar e cassia) observa-se desde a concentração de 0.1% que a GG parece promover uma separação de fases mais extensa entre os dois biopolímeros. Na Figura 4.9.2 B observa-se melhor que a GG (maior:  $M/G$ ,  $M_v$  e  $[\eta]$ ) ocasiona maior descontinuidade do gel de amido do que a GC. Estas imagens de CLSM demonstram ir de encontro com as observações feitas por Yoo *et al.* (2005) e Choi e Yoo (2008) que sugeriram que o aumento do caráter

viscoso dos sistemas mistos de amido e galactomananas estão relacionados com “defeitos” que as gomas ocasionam na rede tridimensional do gel, diminuindo a agregação das cadeias de amido e consequentemente induzindo a redução da elasticidade em geral e aumento das propriedades viscosas (quando comparadas ao gel unicamente formado pelo amido). Este tipo de interação é a mais comum de ocorrer quando dois polímeros diferentes são misturados, ocasionando a incompatibilidade termodinâmica, na qual as interações polímeros-solvente são favorecidas formando fases distintas, cada uma enriquecida num dos polímeros. As diferenças entre as duas variedades de amido na  $\tan \delta$ , ou seja, no comportamento viscoelástico final dos géis mistos pôde ser visualizada através da CLSM. Observando-se as imagens que comparam os géis mistos com a GC entre o amido COM e MPA, de fato, as microestruturas são diferenciadas sendo possível relacionar o comportamento resultante na reologia com as microestruturas dos géis. No gel misto do amido MPA a goma é visualizada em camadas mais finas, melhor distribuída e a estrutura do gel de amido mais interligada. Esta observação está de acordo com a menor alteração na viscoelasticidade do gel misto deste amido. Também não se pode excluir, conforme sugerido por Nagano *et al.* (2008) que observaram por CLSM sistemas mistos de amido e goma guar, que o aumento do caráter viscoso dos géis mistos apresenta relação com uma diminuição da lixiviação dos componentes do amido (que no caso dos géis do amido COM teriam sido mais influenciados por este efeito). Desta maneira pode-se interligar o comportamento reológico com o observado através das microestruturas. Com as observações feitas através da CLSM foi evidente a formação de microestruturas diferentes consoante à concentração, tipo de galactomanana e variedade de amido.

#### *4.3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV)*

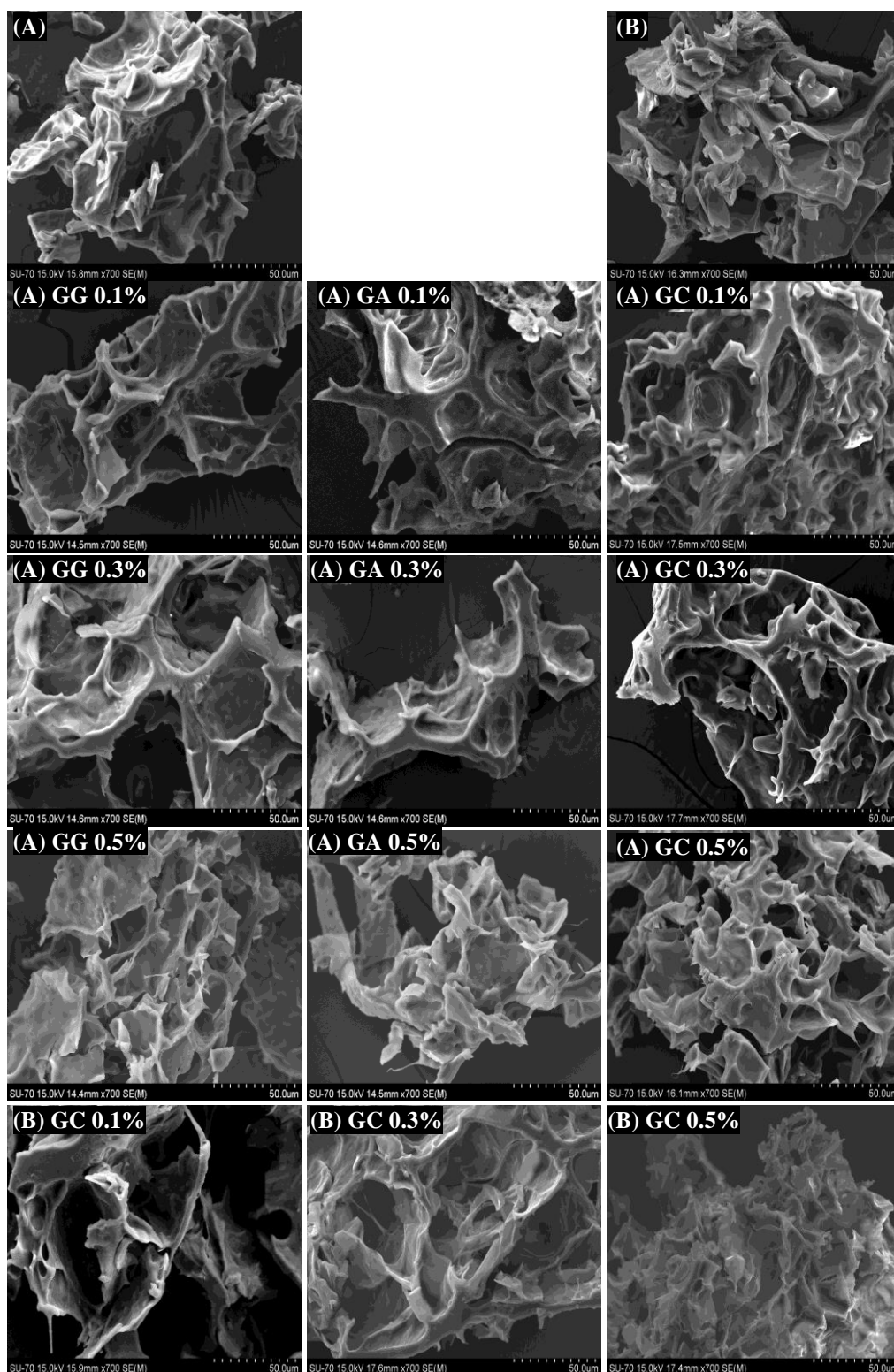
A Figura 4.10 apresenta os sistemas mistos antes da gelatinização. Com a ampliação de 700 X (A), consegue-se visualizar a união dos grânulos de amido que aumenta consoante o aumento da concentração das gomas. Desde 0.1% foi observado que a GG deixou os grânulos de amido mais aglomerados, fator que pode estar ligado à maior viscosidade desta goma. Com a ampliação de 2.500 X (B) a partir de 0.3% consegue-se visualizar melhor as gomas entre os grânulos de amido. A GA e a GC apresentam-se com aspecto em filamentos mais finos e a GG aparenta formar uma camada mais espessa.



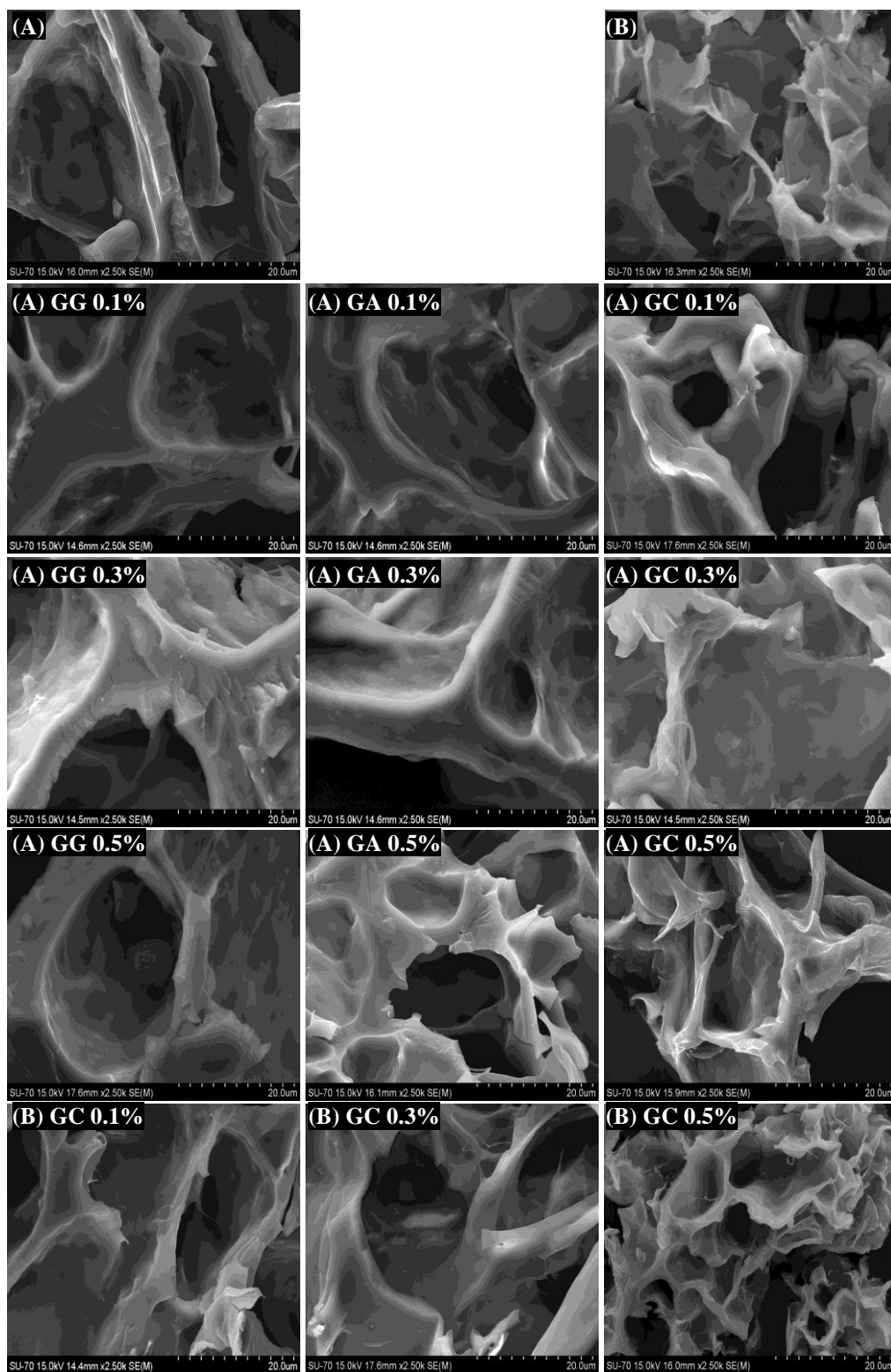


**Figura 4.10:** Micrografias antes da gelatinização. Sistemas mistos de amido e GA: guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC). (A) 700 X, (B) 2500 X.

As Figuras 4.11 e 4.12 apresentam as micrografias que representam a organização geral após liofilização das amostras previamente gelificadas com aumento de 700 e 2500X.



**Figura 4.11:** Micrografias da estrutura dos sistemas mistos de amido e galactomananas após a gelificação. (A) amido COM, (B) amido MPA. Guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC). Ampliação de 700X.

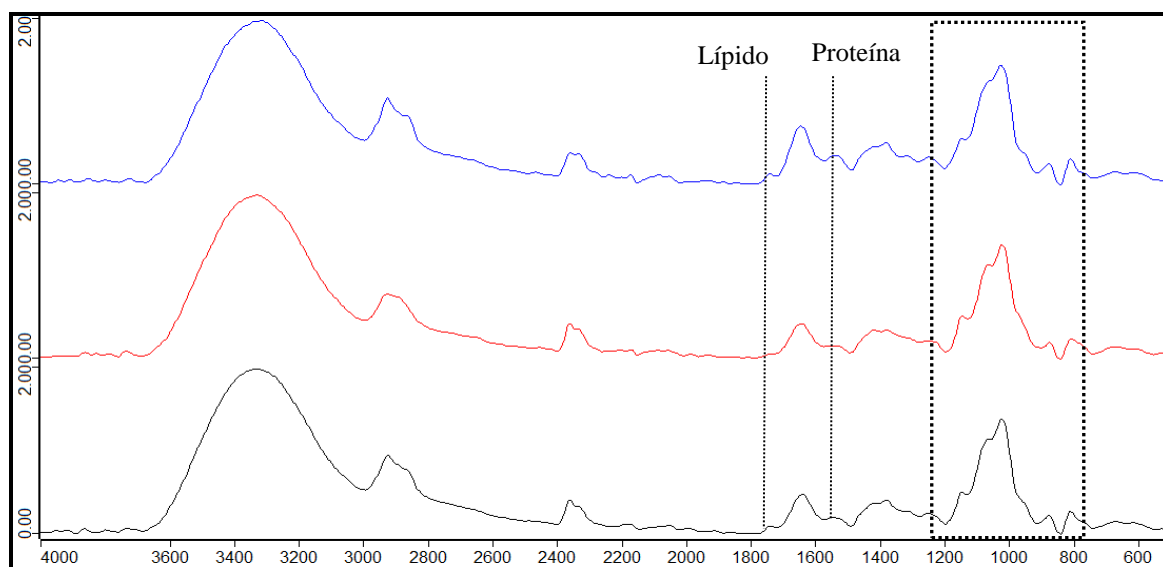


**Figura 4.12:** Micrografias da estrutura dos sistemas mistos de amido e galactomananas após a gelificação. (A) amido COM, (B) amido MPA. Guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC). Ampliação de 2500X.

Quer a organização geral da estrutura dos géis de amido quer a dos géis mistos com as galactomananas apresentam-se com aparência em rede e não uniforme. Comparando-se com os controlos as estruturas dos géis de amido acrescidos das galactomananas demonstram ter intensificado a formação deste aspecto em rede e com a adição de 0.5% das gomas o arranjo apresentou-se mais comprimido. Kaur *et al.* (2008) ao compararem através do MEV micrografias de gel de amido com a goma cassia também observaram que a goma aparentou encolher o arranjo do gel. Na Figura 4.12, devido à maior ampliação, consegue-se observar que a espessura das estruturas formadas demonstram ser mais grossas nos géis mistos com a GG e GA do que com a GC (e em relação aos controlos).

#### 4.3.4 Análises por Espectroscopia de Infravermelho (MID-IR)

Nesta etapa, o MID-IR foi utilizado para verificar a ocorrência de alterações nos espectros como indicação de alguma interação entre os biopolímeros (amido/galactomanana) que seja visível através desta técnica. Igualmente ao capítulo anterior foram obtidos espectros dos sistemas mistos antes do processo de gelatinização e também após a gelificação. Inicialmente na Figura 4.13 são apresentados os espectros das galactomananas, obtidos para a identificação de suas principais bandas espectrais.



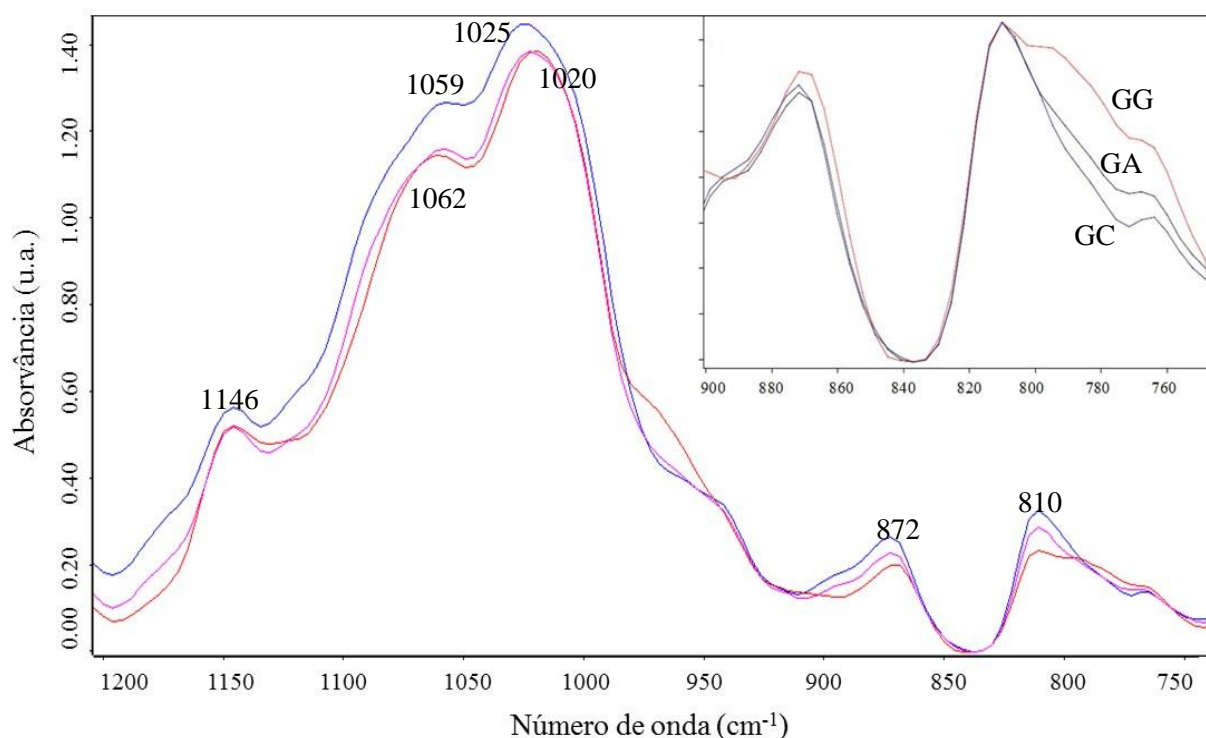
**Figura 4.13:** Perfil dos espectros de MID-IR das galactomananas em pó entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$ . (OPUS 5.0®).

Goma cassia (—), goma guar (—) e goma de alfarroba (—).

No espectro das galactomananas é possível observar as bandas características dos polissacarídeos. A banda larga e intensa observada entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração dos grupos funcionais O-H presentes em suas estruturas (Ma e Pawlik, 2007; Cerqueira *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012b; Kaity *et al.*, 2013; Razavi *et al.*, 2014; Jindal *et al.*, 2013). Entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  estão as vibrações dos grupos C-H (Ma e Pawlik, 2007; Cerqueira *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012b; Kaity *et al.*, 2013; Razavi *et al.*, 2014; Jindal *et al.*, 2013; Moser *et al.*, 2013). Entre 1600 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  a maior contribuição é de grupos C-H (Moser *et al.*, 2013) e também de outros grupos como O-H em 1395  $\text{cm}^{-1}$  (Jindal *et al.*, 2013). Também é possível verificar que as três gomas apresentam algumas impurezas, as bandas localizadas a 1550 e 1740  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de proteínas e lípidos respectivamente. A goma cassia é a que apresenta uma maior quantidade destes compostos, seguida pela de alfarroba e guar com pouca contaminação. Abaixo de 1200 está a região específica para cada polissacarídeo referente às vibrações de grupos como C-O-C e C-O-H (Ma e Pawlik, 2007; Cerqueira *et al.*, 2011). As bandas a 872 e a 810  $\text{cm}^{-1}$  são conhecidas pela presença de unidades de  $\alpha$ -D-manopirranose e  $\beta$ -D-galactopirranose respectivamente (Cerqueira *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012b; Razavi *et al.*, 2014). Para a  $\alpha$ -galactose estão reportados picos a 955 e 764  $\text{cm}^{-1}$  (vibração simétrica de Ring-breathing) (Barker *et al.*, 1954). No caso da goma guar que tem uma quantidade apreciável deste açúcar estas duas bandas podem ser originadas pela  $\alpha$ -galactose. Uma análise mais detalhada à banda de 764  $\text{cm}^{-1}$  permite verificar que esta é mais alta para a goma guar e mais baixa para a cassia.

A Figura 4.14 apresenta a ampliação desta região (1200 a 750  $\text{cm}^{-1}$ ) demonstrando os números de onda nos quais são observadas as bandas de absorção de maior intensidade nos espectros das galactomananas.

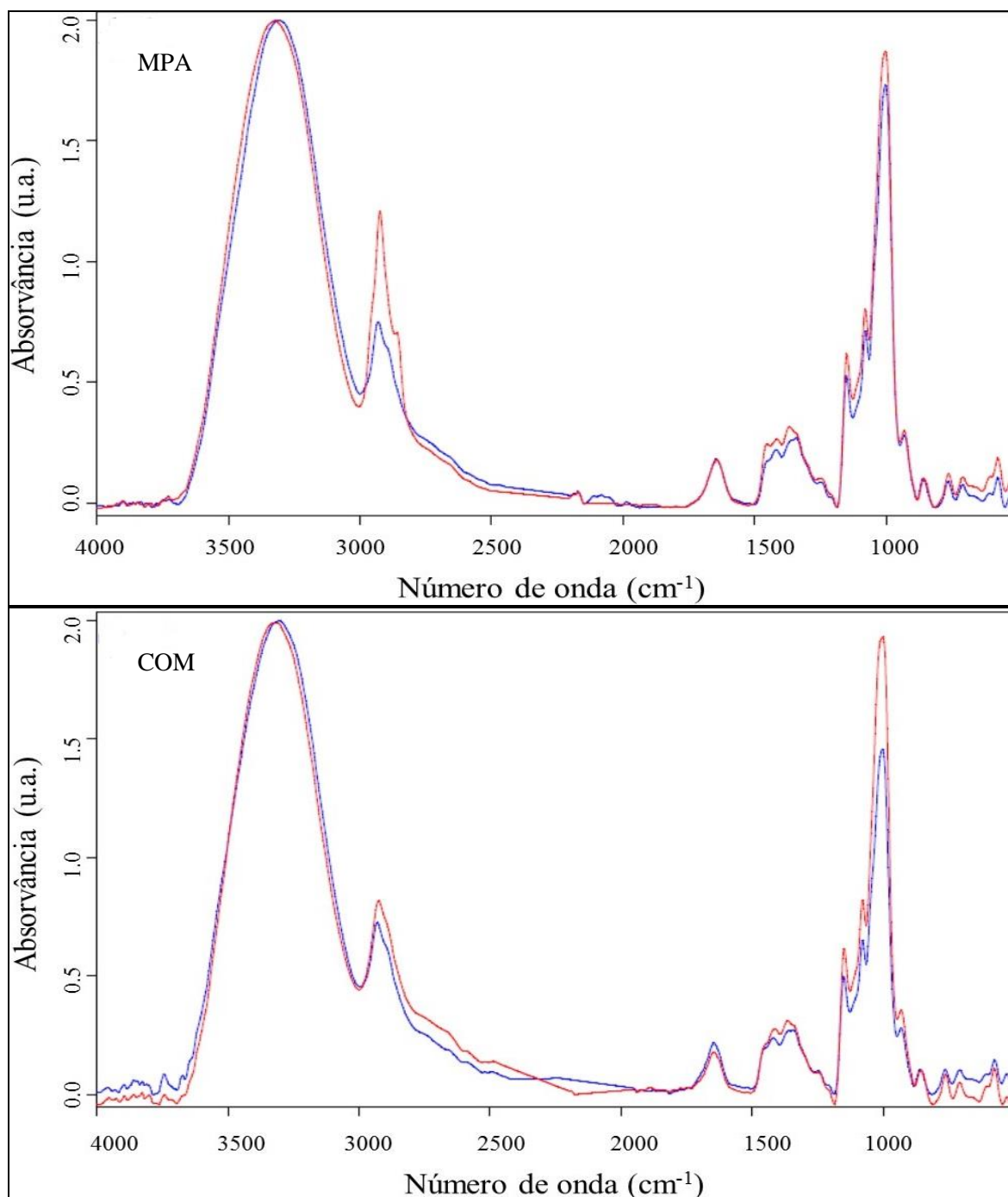




**Figura 4.14:** Região espectral entre 1200 e 700  $\text{cm}^{-1}$  (espectros com correção de linha de base e normalizados). Na ampliação (900 a 700  $\text{cm}^{-1}$ ) normalizou-se pelo pico de 810  $\text{cm}^{-1}$  para facilitar a observação a 764  $\text{cm}^{-1}$ . (OPUS 5.0®). Goma cassia (—), goma guar (—) e goma de alfarroba (—).

A Figura 4.15 apresenta os espectros dos amidos MPA e COM antes e depois de gelatinizados. Nesta figura, observa-se que o MPA apresenta uma modificação nos picos de C-H entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Ocorre um grande aumento na intensidade de vibração, o qual é também refletido nos picos a 1453, 1412 e 1366  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes as deformações de C-H. Este comportamento indica que os grupos  $\text{CH}_2$  apresentam maior liberdade de vibração com a gelatinização. Este efeito é mais evidente no amido MPA comparativamente ao COM. Na zona de 1000  $\text{cm}^{-1}$  é interessante verificar que existe um comportamento diferente entre os dois amidos. No caso do MPA o pico é ligeiramente mais alto no amido gelatinizado, podendo indicar um reforço de pontes de hidrogénio no amido. No caso do COM este reforço é muito evidente com o aumento da intensidade deste pico e a diminuição da banda da água em 1645  $\text{cm}^{-1}$ . Estes resultados levam a concluir que a forma como os dois amidos se estruturam com a gelatinização é diferenciada. O amido

COM parece ter menos tendência para desagregar que o MPA. Isto está de acordo com o observado pela microscopia confocal, na qual o amido MPA gelatinizado parece conservar menos a sua estrutura granular do que o COM (Figura 4.9).



**Figura 4.15:** Média dos espectros de MID-IR dos amidos MPA e COM antes e após a gelatinização (entre 4000 e 600 cm<sup>-1</sup>) normalizados e com correção de linha de base (OPUS 5.0®). Antes da gelatinização (—), após a gelatinização (—).

Entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  os grupos funcionais O-H quer do amido quer das galactomananas vibram e estão relacionados com a formação de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares. A Tabela 4.6 apresenta o número de onda que demarcou a maior intensidade de absorvância neste intervalo para os amidos (controlos) e para os amidos adicionados das galactomananas antes e após o processo de gelatinização.

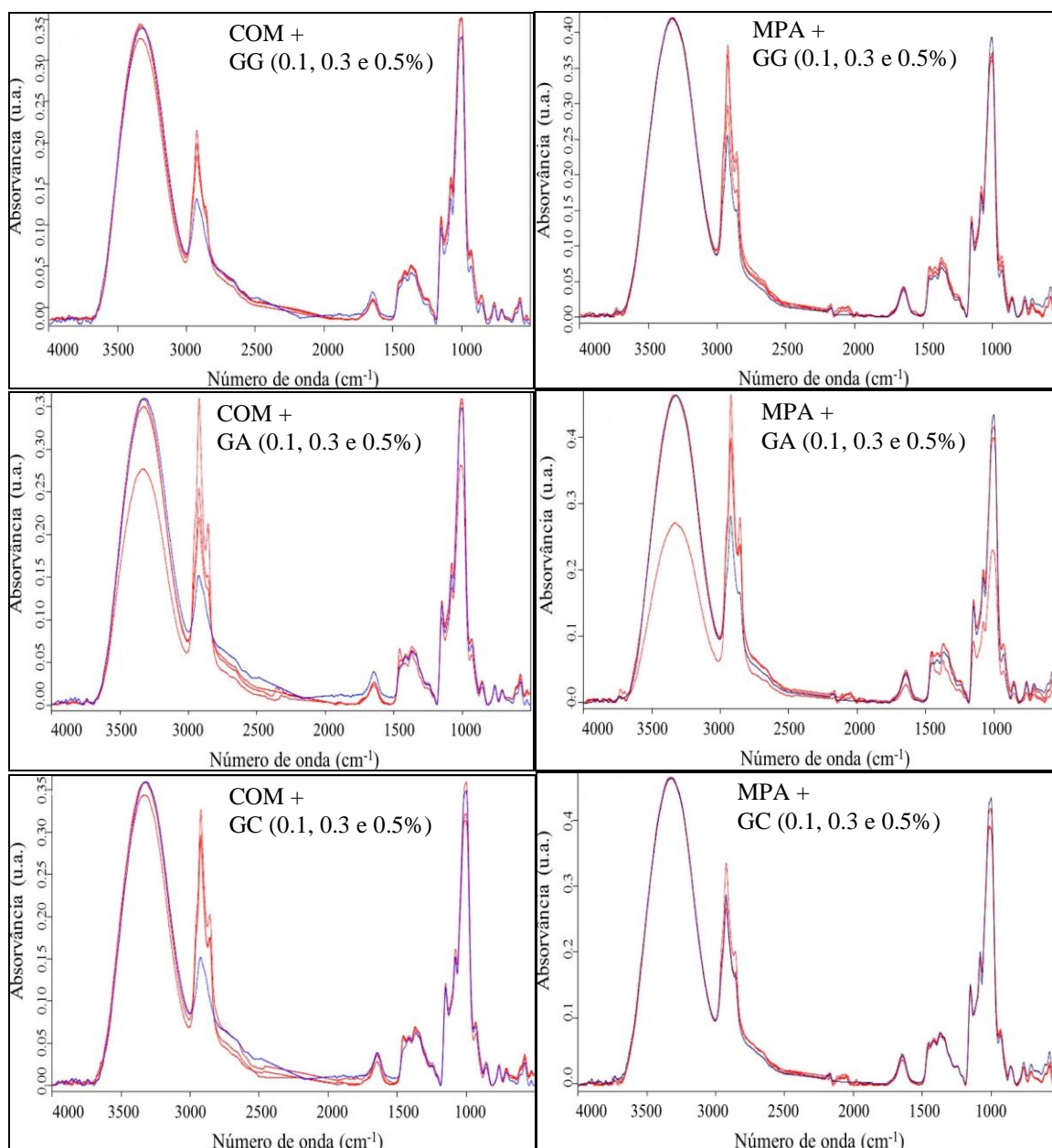
**Tabela 4.6:** Posição espectral dos amidos controlos, sistemas mistos e géis mistos entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Guar (GG), alfarroba (GA) e cassia (GC).

	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )			
	MPA		COM	
<b>Controlos</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.1% GG</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.1% GA</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.1% GC</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.3% GG</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.3% GA</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.3% GC</b>	3310*	3321**	3310*	3321**
<b>+ 0.5% GG</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.5% GA</b>	3310*	3321**	3310*	3324**
<b>+ 0.5% GC</b>	3310*	3321**	3310*	3324**

(\*) Antes do processo de gelatinização: sistemas; (\*\*) Após o processo de gelatinização: géis.

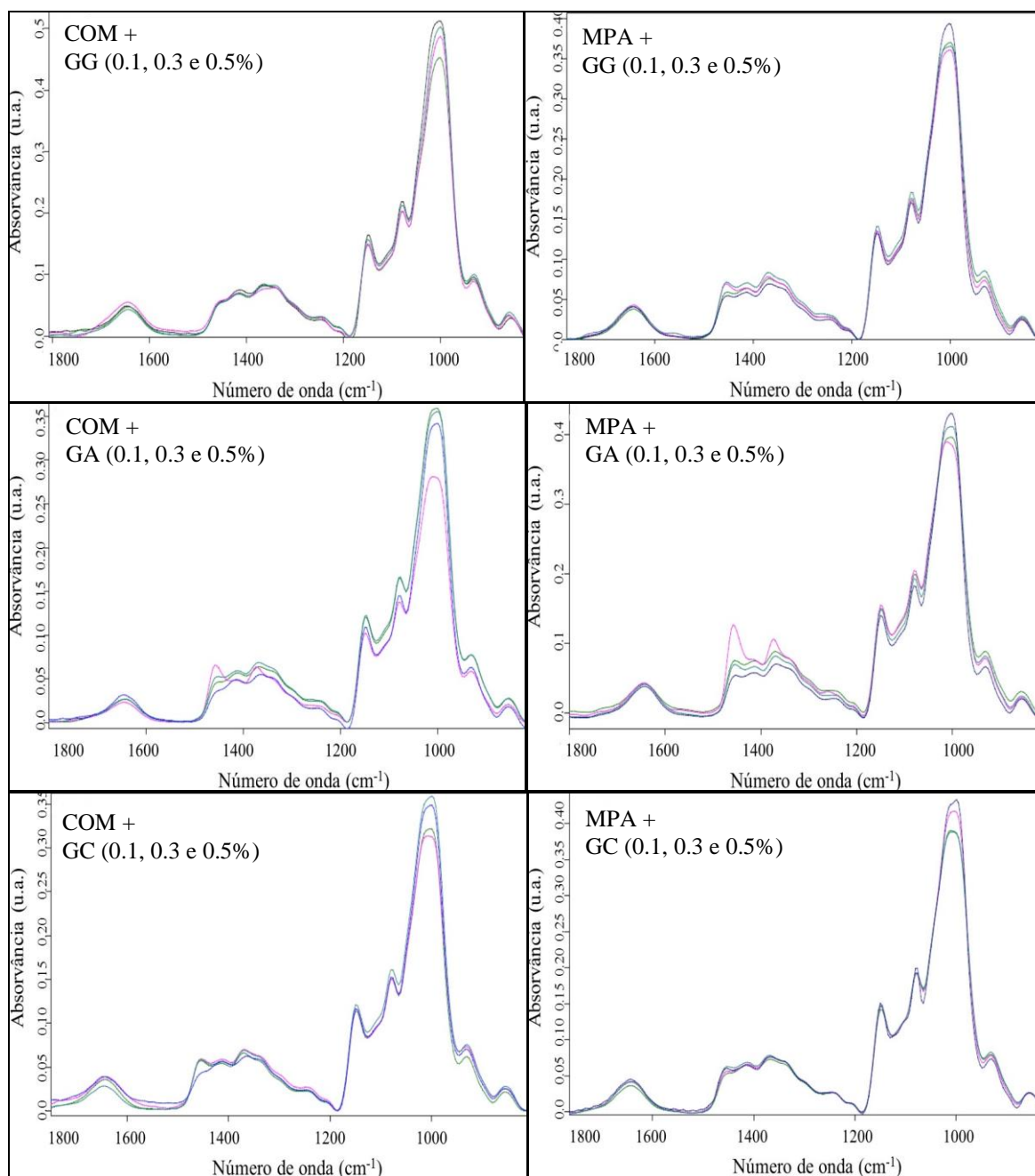
Como é possível observar, através dos números de onda da tabela acima, a adição das galactomananas aos amidos, antes do processo de gelatinização, não ocasionou deslocamentos na posição espectral neste intervalo. Após o processo de gelatinização, na maioria dos géis, ocorreu o deslocamento de 3310  $\text{cm}^{-1}$  para 3321  $\text{cm}^{-1}$  (ordem de 11  $\text{cm}^{-1}$ ) devido à formação das ligações de hidrogénio intra e intermoleculares. Entretanto, quer os controlos quer os géis mistos resultaram em deslocamentos semelhantes. Isto demonstra que este deslocamento está relacionado com o processo de gelatinização sem interferência das diferentes gomas e concentrações adicionadas. A banda da água a 1654  $\text{cm}^{-1}$  sofre pequenas modificações, que podem ser interpretadas como a quantidade de água remanescente no sistema depois da gelatinização.

As Figuras 4.16 (A) e 4.16 (B) apresentam o efeito da adição das galactomananas aos dois amidos utilizados. Havia-se mencionado que o aumento da intensidade dos picos correspondentes às ligações C-H podem estar correlacionados com uma maior liberdade de vibração dos grupos CH<sub>2</sub> ocasionada pela gelatinização. De acordo com este pressuposto, o amido MPA demonstra sofrer uma grande variação na mobilidade durante a gelatinização, enquanto o amido COM não apresenta grande modificação nas ligações C-H e, aumenta até a zona de 1000 cm<sup>-1</sup> a qual está reportada ser sensível à existência de ligações de hidrogénio. Como se pode verificar na figura, é visível que a adição das gomas induzem a uma maior variação nos espectros do amido COM, favorecendo a mobilidade dos CH<sub>2</sub>. Comparativamente, a goma guar é a que menos afeta o amido COM. No caso do amido MPA o efeito da adição de gomas não é tão evidente, sendo que o efeito menos acentuado é apresentado pela goma cassia. Um caso curioso é o da goma de alfarroba a 0.3% que ocasiona um aumento muito notório nas intensidades dos picos de C-H em todo o espetro nos dois amidos. Com os dados deste trabalho não podemos especular sobre o que pode estar a ocasionar esta modificação no sistema gelatinizado com esta goma e a esta concentração.



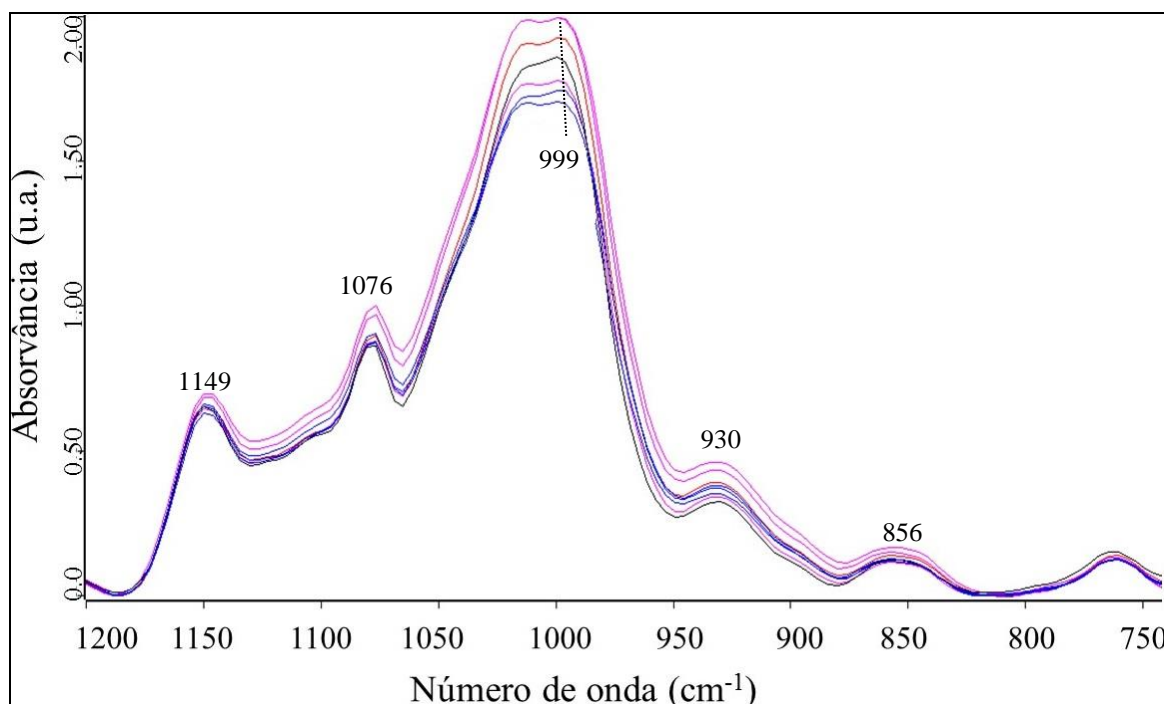
**Figura 4.16 (A):** Média dos espectros de MID-IR dos géis dos amidos MPA e COM adicionados das galactomananas (entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ ). Espectros normalizados e com correção de linha de base (OPUS 5.0®).

Controlos (—), sistemas mistos (—).



**Figura 4.16 (B):** Média dos espectros de MID-IR dos géis dos amidos MPA e COM adicionados das galactomananas. Ampliação entre 1800 e 800  $\text{cm}^{-1}$ ). Espectros normalizados e com correção de linha de base (OPUS 5.0®). Controlos (—), 0.1% (—), 0.3% (—), 0.5% (—).

Na região da absorvância dos grupos C-O-C e C-OH a adição das galactomananas não ocasionou nenhum deslocamento nos números de onda dos géis (mantiveram-se em 1149, 1076, 1014, 999, 930 e 856  $\text{cm}^{-1}$ ) conforme observa-se na Figura 4.17.

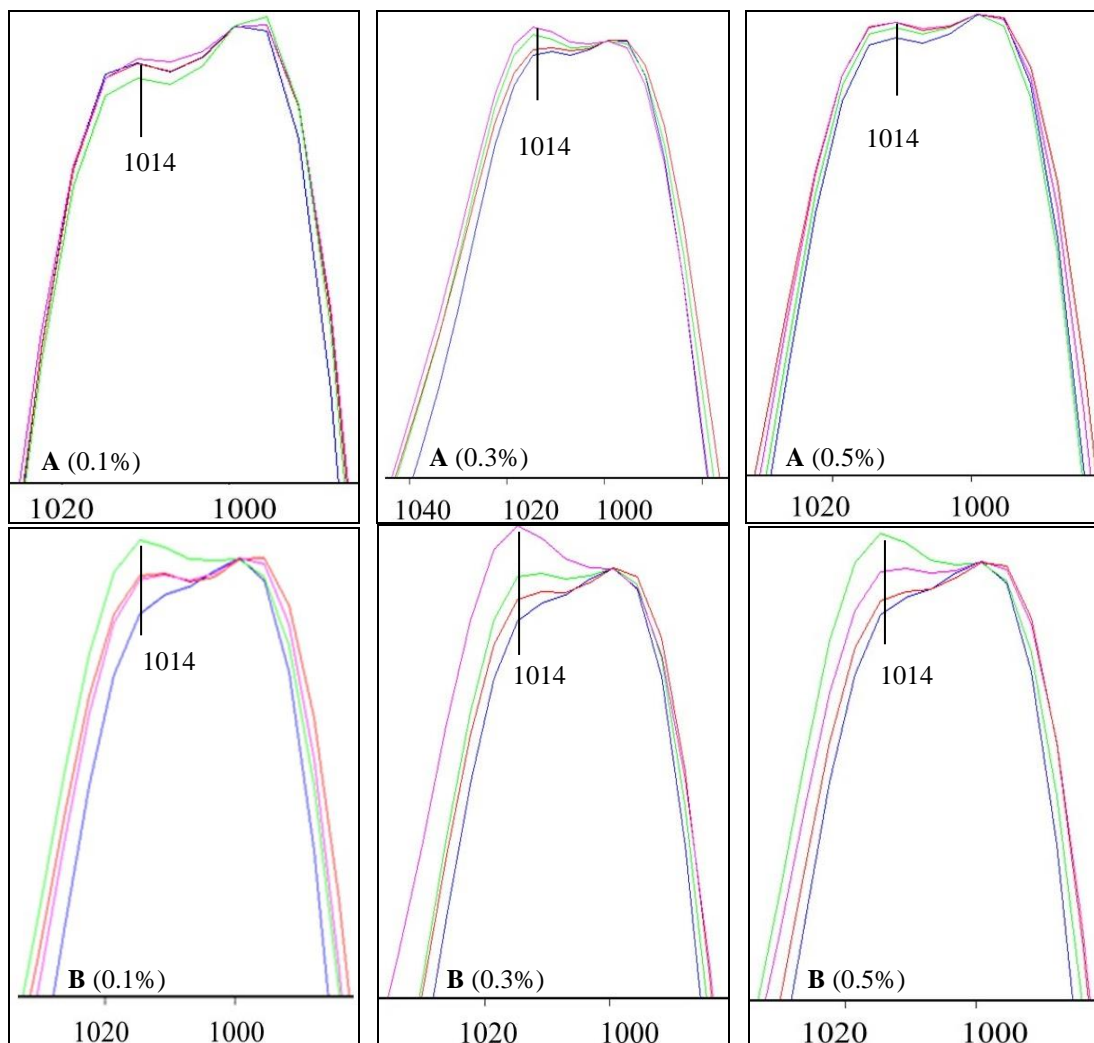


**Figura 4.17:** Exemplo da ampliação da região espectral entre 1200 e 750  $\text{cm}^{-1}$  dos géis de amido e galactomananas (GA). Média dos espectros normalizados e com correção de linha de base (OPUS 5.0®). Absorvância vs número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

MPA (—), COM (—), MPA + gomas 0.5% (—), COM + gomas 0.5% (—)

Apesar de não haver deslocamentos na região específica dos polissacarídeos, foram analisadas as diferenças na intensidade de absorvância relativa entre a banda de 999  $\text{cm}^{-1}$  e 1014  $\text{cm}^{-1}$  (região amorfa do amido) nos géis mistos. A Figura 4.18 apresenta esta região ampliada e que foi ajustada quanto à intensidade no número de onda a 999  $\text{cm}^{-1}$ . Pode-se observar que nos géis mistos com o amido COM praticamente não ocorreu diferença com relação ao controlo (exceção a 0.3% com a GA e GC). Já nos géis mistos com o amido MPA a adição das gomas ocasionou aumento da intensidade em todas as concentrações utilizadas com relação ao gel controlo. O aumento em 1014  $\text{cm}^{-1}$ , em geral, foi mais intenso quer para a goma cassia quer para a de alfarroba. Em conclusão a adição das gomas têm uma maior influência no amido COM do que no MPA contudo, como o amido MPA já tinha uma maior mobilidade quando gelatinizado, é possível observar um aumento da fração amorfa do MPA com a adição das gomas, sendo que a goma guar é a que menos modificação apresenta neste aspeto.





**Figura 4.18:** Ampliação da região espectral próxima a  $1000\text{ cm}^{-1}$  dos géis mistos.

A: géis com o amido COM. B: géis com o amido MPA.

Amido (—), GG (—), GA (—), GC (—).

#### 4.3.5 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

O efeito da adição das galactomananas sobre as propriedades térmicas do amido foi analisado através do DSC. Para além do processo de gelatinização foi estudada a retrogradação após 7, 14 e 40 dias de armazenamento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foram avaliados os mesmos parâmetros já discutidos nos capítulos anteriores: temperatura inicial da transição ( $T_0$ ); temperatura de pico ( $T_p$ ); temperatura de conclusão ( $T_c$ ); entalpia de gelatinização e de retrogradação ( $\Delta H_{gel}$ ,  $\Delta H_{ret}$ ); faixa de temperatura de gelatinização e de retrogradação ( $R_{gel}$ ,  $R_{ret}$ ), índice de altura do pico ( $PHI$ ) e percentagem de retrogradação ( $R$ ).



#### *4.3.5.1 Efeito das Galactomananas na Gelatinização do Amido*

Todos os termogramas obtidos apresentaram um pico definido na região entre 60 e 80 °C (semelhante a Figura 2.10), correspondente à endotérmica de gelatinização do amido. Na Tabela 4.7 estão apresentados os resultados obtidos para as temperaturas que correspondem às transições do processo de gelatinização bem como as respectivas entalpias, faixas de temperatura de gelatinização e índices de altura do pico para as suspensões de amido a 20% (m/m) e para as suspensões de amido com galactomananas adicionadas (0.1, 0.3 e 0.5%).

Os resultados demonstram que as galactomananas alteraram os parâmetros térmicos do amido. Em termos da temperatura inicial do processo de gelatinização ( $T_0$ ) a adição das gomas proporcionou um significativo aumento com relação aos controlos. Nesta comparação as gomas GG, GA e GC a 0.1% resultaram em um aumento de  $T_0$  para o amido COM na ordem de 2.5 °C, 2.3 °C e 1.4 °C, respetivamente (no amido MPA a GC elevou a  $T_0$  de forma semelhante, ou seja, 1.3 °C). Aumentando-se a concentração das gomas para 0.3 e 0.5% não foi observada uma alteração significativa na  $T_0$  com relação a 0.1% (com exceção da GC a 0.3% no amido COM; aproximadamente 1 °C). Nos sistemas mistos com o amido COM, as GG e GA, as quais apresentam a maior proporção de galactose na cadeia principal de manose, maior  $M_v$  e  $[\eta]$ , foram as galactomananas que mais elevaram a  $T_0$ , embora as diferenças sejam muito reduzidas e estatisticamente não significativas. Assim, a  $T_0$  dos sistemas mistos de amido/galactomananas foi expressivamente alterada com relação aos controlos, mas praticamente independente do tipo ou da concentração da goma adicionada.

**Tabela 4.7:** Propriedades térmicas resultantes do processo de gelatinização dos sistemas mistos de amido a 20% (COM e MPA) e galactomananas a 0.1, 0.3 e 0.5% (m/m).

Goma guar (GG), goma de alfarroba (GA) e goma cassia (GC).

Gelatinização						
	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_{gel}$ (J/g)	$R_{gel}$ (°C)	$PHI$ (Jg <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )
<b>COM 20%</b>	63.7 <sup>a</sup> ± 0.5	70.6 <sup>a</sup> ± 0.4	75.9 <sup>ab</sup> ± 0.2	11.0 <sup>abc</sup> ± 0.3	13.9 <sup>i</sup> ± 1.3	1.6 <sup>a</sup> ± 0.2
<b>COM 20% + 0.1% GG</b>	66.2 <sup>de</sup> ± 0.3	71.3 <sup>abc</sup> ± 0.2	76.5 <sup>bc</sup> ± 0.4	10.5 <sup>a</sup> ± 0.1	10.2 <sup>ab</sup> ± 0.2	2.1 <sup>bcdef</sup> ± 0.1
<b>COM 20% + 0.1% GA</b>	66.0 <sup>de</sup> ± 0.2	71.3 <sup>abc</sup> ± 0.4	76.2 <sup>ab</sup> ± 0.5	10.4 <sup>a</sup> ± 0.2	10.5 <sup>abc</sup> ± 0.5	2.0 <sup>abcde</sup> ± 0.1
<b>COM 20% + 0.1% GC</b>	65.1 <sup>bc</sup> ± 0.3	71.3 <sup>abc</sup> ± 0.2	76.3 <sup>ab</sup> ± 0.1	11.5 <sup>abcd</sup> ± 0.8	12.4 <sup>cdef</sup> ± 0.9	1.9 <sup>abcd</sup> ± 0.3
<b>COM 20% + 0.3% GG</b>	66.3 <sup>de</sup> ± 0.4	71.3 <sup>abc</sup> ± 0.3	76.3 <sup>ab</sup> ± 0.1	12.2 <sup>cd</sup> ± 1.6	9.9 <sup>a</sup> ± 0.8	2.5 <sup>f</sup> ± 0.2
<b>COM 20% + 0.3% GA</b>	66.0 <sup>de</sup> ± 0.3	71.4 <sup>bcd</sup> ± 0.3	76.5 <sup>bc</sup> ± 0.6	11.8 <sup>bcd</sup> ± 0.9	10.9 <sup>abcd</sup> ± 0.1	2.2 <sup>cdef</sup> ± 0.2
<b>COM 20% + 0.3% GC</b>	66.1 <sup>de</sup> ± 0.5	71.9 <sup>cdef</sup> ± 0.6	77.3 <sup>cd</sup> ± 0.5	11.7 <sup>bcd</sup> ± 0.7	11.5 <sup>abcde</sup> ± 0.3	2.0 <sup>abcde</sup> ± 0.2
<b>COM 20% + 0.5% GG</b>	65.5 <sup>bcd</sup> ± 0.3	71.0 <sup>ab</sup> ± 0.6	75.5 <sup>a</sup> ± 0.4	12.6 <sup>d</sup> ± 0.4	11.0 <sup>abcd</sup> ± 1.3	2.3 <sup>def</sup> ± 0.2
<b>COM 20% + 0.5% GA</b>	65.8 <sup>cd</sup> ± 0.4	71.0 <sup>ab</sup> ± 0.4	75.6 <sup>ab</sup> ± 0.3	12.1 <sup>cd</sup> ± 0.7	10.5 <sup>abc</sup> ± 0.9	2.3 <sup>def</sup> ± 0.1
<b>COM 20% + 0.5% GC</b>	65.0 <sup>bc</sup> ± 0.4	71.7 <sup>bcd</sup> ± 0.6	76.4 <sup>abc</sup> ± 1.0	12.0 <sup>cd</sup> ± 1.0	13.4 <sup>ef</sup> ± 1.7	1.8 <sup>abc</sup> ± 0.4
<b>MPA 20%</b>	64.8 <sup>b</sup> ± 0.4	71.8 <sup>cdef</sup> ± 0.4	78.1 <sup>d</sup> ± 0.8	11.9 <sup>bcd</sup> ± 0.4	13.9 <sup>i</sup> ± 0.8	1.7 <sup>ab</sup> ± 0.2
<b>MPA 20% + 0.1% GC</b>	66.1 <sup>de</sup> ± 0.4	72.2 <sup>ef</sup> ± 0.3	78.1 <sup>d</sup> ± 0.3	12.7 <sup>d</sup> ± 1.1	12.1 <sup>bcdef</sup> ± 1.3	2.1 <sup>bcdef</sup> ± 0.4
<b>MPA 20% + 0.3% GC</b>	66.7 <sup>e</sup> ± 0.8	72.5 <sup>f</sup> ± 0.4	79.2 <sup>e</sup> ± 0.9	14.5 <sup>ef</sup> ± 1.1	11.7 <sup>abcde</sup> ± 1.0	2.5 <sup>f</sup> ± 0.4
<b>MPA 20% + 0.5% GC</b>	65.8 <sup>cd</sup> ± 0.9	72.1 <sup>def</sup> ± 0.3	78.1 <sup>d</sup> ± 0.4	14.9 <sup>f</sup> ± 0.6	12.7 <sup>def</sup> ± 2.1	2.4 <sup>ef</sup> ± 0.5

$T_0$ : temperatura inicial,  $T_p$ : temperatura de pico,  $T_c$ : temperatura de conclusão,  $\Delta H_{gel}$ : entalpia de gelatinização,  $R_{gel}$ : faixa de gelatinização 2 ( $T_p - T_0$ ) e  $PHI$ : índice de altura de pico  $\Delta H_{gel} / (T_p - T_0)$ .

Os valores apresentados correspondem à média de três ensaios ± desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Quer as temperaturas de pico ( $T_p$ ) quer as de conclusão ( $T_c$ ) apresentaram-se praticamente inalteradas com relação aos controlos, concentração e tipo de galactomanana (exceção da  $T_c$  da GC a 0.3% no amido MPA).

As entalpias de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ) dos sistemas mistos dependeram do amido utilizado. Nos sistemas mistos elaborados com o amido COM, somente a GG a 0.5% ocasionou um aumento significativo na entalpia quando comparada ao controle. Entre as galactomananas foi observada uma tendência de aumento da  $\Delta H_{gel}$  (GG > GA > GC) no entanto, esta elevação não foi significativa. Nos sistemas mistos com o amido MPA, nos quais a GC foi adicionada, ocorreu um significativo aumento da  $\Delta H_{gel}$  a partir da concentração de 0.3% da goma (superior a todas outras  $\Delta H_{gel}$ ). O valor da entalpia, fornecido pelo DSC, está correlacionado com a energia necessária para a rutura das estruturas cristalinas da amilopectina. Em sistemas de amidos mistos com outros hidrocolóides, a diminuição da entalpia de gelatinização tem sido atribuída à redução da água disponível e associada à gelatinização parcial das regiões cristalinas do amido (Chaisawang e Supphantharika, 2005, 2006; Huang *et al.*, 2009), para além de interações entre os biopolímeros (Chaisawang e Supphantharika, 2006; Šubarić *et al.*, 2011). Em contrapartida, o aumento da  $\Delta H_{gel}$  tem sido correlacionado com o grau de associação entre o amido e gomas, devido à redução da mobilidade das cadeias de amido e, consequentemente, uma energia térmica adicional é necessária para a sua rutura durante o aquecimento (Lee *et al.*, 2002; Biliaderis *et al.*, 1997; Leite *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2013). Comparando-se o significativo aumento na  $\Delta H_{gel}$  que a goma cassia ocasionou, quando misturada ao amido MPA com relação à mistura com o amido COM, uma possível explicação pode ser correlacionada com uma variação na integridade dos grânulos de amido. Com uma maior desintegração granular durante o aquecimento, maior proporção de amilopectina é lixiviada e exposta para interagir com a goma, sendo que, este fator poderia justificar a maior energia que foi necessária para os sistemas mistos com o amido MPA, sugerindo a ocorrência de um determinado grau de associação entre os biopolímeros. De fato, Biliaderis *et al.* (1997) observaram uma  $\Delta H_{gel}$  consideravelmente maior quando diversos hidrocolóides, entre estes a goma guar, foram adicionados ao amido de milho com alto teor de amilopectina em comparação com amido de trigo. No presente estudo, a microscopia confocal (CLSM) permitiu a observação de microestruturas nos sistemas mistos que apresentaram-se com um aspecto da rede tridimensional do gel de amido mais interligada para o amido MPA do que para o amido COM, podendo remeter a uma maior desintegração dos grânulos ocasionando maior contato entre a goma e as cadeias de amido. Além disto, o maior comprimento das duplas hélices da amilopectina no amido MPA, indicada pela maior  $T_p$ , pode ser outra possibilidade que auxiliou para a maior associação.

Pode-se ainda argumentar que a redução da água disponível para a gelatinização do amido na presença das gomas não foi o fator relevante sobre a  $\Delta H_{gel}$  dos sistemas em estudo. Como já foi mencionado, menor disponibilidade de água livre na presença de outros hidrocolóides poderia ser associada ao decréscimo da entalpia e, em nosso caso, ao considerar a maior  $[\eta]$  da GG deveria-se esperar menores entalpias para os sistemas de amido com a GG do que com a GC, se este fosse o caso. Como os valores apresentaram uma relação oposta a esta, mesmo com pequenas diferenças entre as gomas ( $GG > GA > GC$ ), pode-se considerar que ocorreram associações entre os sistemas mistos do amido COM quando 0.5% da goma guar foi adicionada, elevando assim a  $\Delta H_{gel}$ , e sendo estas mais favorecidas quando comparadas com as outras gomas.

A faixa de temperatura na qual ocorreu a gelatinização do amido ( $R_{gel}$ ) apresentou alteração com relação aos controles após a adição das galactomananas. Houve diminuição da  $R_{gel}$  com a GG e GA sendo que a GC, quando comparada com ambos os amidos controles, não alterou significativamente este parâmetro. Esta relação pode estar a demonstrar que apesar de a GC ter indicado menos associação com o amido, em comparação com as outras galactomananas, esta pode ser mais estável necessitando de uma faixa mais ampla de temperatura para completar o processo (já que este parâmetro sugere diferentes resistência ou força nas ligações). O  $PHI$  (uniformidade na gelatinização) dos sistemas mistos aumentou com relação aos controles e entre as galactomananas foi menor para a GC. No amido MPA a GC proporcionou um aumento mais acentuado do que com o amido COM.

Em outros trabalhos realizados com sistemas mistos de amido e galactomananas (além de outros hidrocolóides) as alterações nas temperaturas de transição e entalpias, assim como na  $R_{gel}$  são bastante variadas dependendo de fatores como, por exemplo, o tipo de amido, concentração dos polímeros e tipo de hidrocolóide. Na introdução deste capítulo foi citado o trabalho de Šubarić *et al.* (2011) com as gomas guar e de alfarroba que observaram pouca alteração na  $T_0$  e  $T_p$ . Houve aumento na  $T_c$  com a guar no amido de mandioca, mas não no amido de milho sendo que a  $\Delta H_{gel}$  diminuiu mais com a goma guar. Leite *et al.* (2012) utilizaram outros hidrocolóides (ex.: xantana e carrageninas) observando um pequeno aumento na  $T_0$  e  $T_c$  com relação aos controles, não alteração na  $T_p$  e quer a elevação quer a diminuição na entalpia dependendo do hidrocolóide. Ahmad e

Willians (2001) trabalharam com amido de sagu adicionados de guar e alfarroba (1%) e observaram aumento na  $T_0$  e  $T_p$  (inferior a 1 °C) e a entalpia não foi afetada. Mali *et al.* (2003) em misturas de amido de inhame com a guar e xantana (0.1, 0.3 e 0.4%) não observaram alterações nas temperaturas de transição e entalpias. Ferrero *et al.* (1996) observaram aumento na  $T_0$  do amido de milho quando misturado com a guar e alfarroba (goma/amido: 1:10, 1:2 e 1:1) entre outros hidrocolóides. À semelhança do presente trabalho, o aumento mais intenso da  $T_0$  ocorreu em relação aos controles (nos hidrocolóides carregados houve maior dependência da concentração). Neste estudo também se observou aumento na  $\Delta H_{gel}$  quanto maior a concentração das gomas nos sistemas. Biliaderis *et al.* (1997) observaram aumento na entalpia com relação aos controles quando diversos hidrocolóides (entre eles a goma guar) foram adicionados aos amidos de trigo e amido com alto teor de amilopectina. Huang (2009) com amidos de raízes e tubérculos adicionados de GG e GA observaram pouca alteração na  $T_0$ , aumento na  $T_p$  dependendo do amido, aumento na  $R_{gel}$  e diminuição nas entalpias. Torres *et al.* (2013) em sistemas mistos de amido de castanha (50%) e goma guar (0.5, 1, 1.5 e 2%) observaram aumento significativo na  $T_0$  com 0.5% em relação ao controle, aumento na  $T_p$  e na  $\Delta H_{gel}$  acima de 1% e a não alteração na  $T_c$ .

#### 4.3.5.2 Efeito das Galactomananas na Retrogradação do Amido

Após os amidos com e sem galactomananas serem gelificados *in situ* no calorímetro, procedeu-se ao acondicionamento a 4 °C durante 7, 14 e 40 dias. Após estes períodos de tempo os géis foram submetidos a novo aquecimento no calorímetro para verificar o efeito da adição das galactomananas sobre a retrogradação do amido (sob as mesmas condições utilizadas na gelatinização).

Os resultados estão apresentados na Tabela 4.8. As endotermas obtidas após estes ciclos de aquecimento apresentaram-se bem definidas entre aproximadamente 40 e 65 °C.

**Tabela 4.8:** Propriedades térmicas após a retrogradação dos géis mistos de amido (COM e MPA 20%) e galactomananas GG, GA e GC.

	Retrogradação (7 dias)						Retrogradação (14 dias)						Retrogradação (40 dias)					
	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_{ret}$ (J/g)	$R_{ret}$ (°C)	$R$ (%)	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_{ret}$ (J/g)	$R_{ret}$ (°C)	$R$ (%)	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_{ret}$ (J/g)	$R_{ret}$ (°C)	$R$ (%)
<b>COM</b>	<b>38.6<sup>ab</sup></b>	<b>53.6<sup>ab</sup></b>	<b>63.7<sup>a</sup></b>	<b>5.8<sup>ab</sup></b>	<b>30.1<sup>de</sup></b>	<b>52.6<sup>ab</sup></b>	<b>39.9<sup>ab</sup></b>	<b>53.6<sup>cdef</sup></b>	<b>64.6<sup>de</sup></b>	<b>5.9<sup>ab</sup></b>	<b>27.3<sup>abc</sup></b>	<b>54.1<sup>bcd</sup></b>	<b>40.0<sup>ab</sup></b>	<b>52.8<sup>ab</sup></b>	<b>62.7<sup>a</sup></b>	<b>8.4<sup>ab</sup></b>	<b>25.7<sup>abcd</sup></b>	<b>76.9<sup>def</sup></b>
<b>20%</b>	$\pm 0.3$	$\pm 0.2$	$\pm 0.4$	$\pm 0.3$	$\pm 1.0$	$\pm 3.4$	$\pm 0.5$	$\pm 0.4$	$\pm 0.3$	$\pm 0.6$	$\pm 1.7$	$\pm 5.6$	$\pm 0.9$	$\pm 0.3$	$\pm 0.2$	$\pm 0.3$	$\pm 1.2$	$\pm 3.3$
<b>+0.1%GG</b>	<b>40.5<sup>d</sup></b>	<b>54.8<sup>c</sup></b>	<b>66.3<sup>d</sup></b>	<b>5.9<sup>ab</sup></b>	<b>28.6<sup>cde</sup></b>	<b>56.5<sup>abc</sup></b>	<b>39.0<sup>a</sup></b>	<b>52.7<sup>ab</sup></b>	<b>63.3<sup>abc</sup></b>	<b>6.1<sup>b</sup></b>	<b>27.5<sup>bc</sup></b>	<b>58.4<sup>cdef</sup></b>	<b>42.3<sup>d</sup></b>	<b>54.3<sup>de</sup></b>	<b>64.8<sup>e</sup></b>	<b>8.6<sup>ab</sup></b>	<b>24.1<sup>ab</sup></b>	<b>81.9<sup>f</sup></b>
	$\pm 0.7$	$\pm 0.7$	$\pm 0.7$	$\pm 0.7$	$\pm 2.6$	$\pm 7.5$	$\pm 1.4$	$\pm 0.3$	$\pm 1.0$	$\pm 0.4$	$\pm 3.0$	$\pm 4.4$	$\pm 0.9$	$\pm 0.5$	$\pm 0.3$	$\pm 0.1$	$\pm 0.7$	$\pm 0.9$
<b>+0.1%GA</b>	<b>40.9<sup>d</sup></b>	<b>53.4<sup>ab</sup></b>	<b>63.3<sup>a</sup></b>	<b>5.4<sup>a</sup></b>	<b>25.0<sup>ab</sup></b>	<b>52.1<sup>a</sup></b>	<b>40.2<sup>ab</sup></b>	<b>52.8<sup>ab</sup></b>	<b>62.8<sup>a</sup></b>	<b>6.1<sup>b</sup></b>	<b>25.1<sup>ab</sup></b>	<b>58.8<sup>def</sup></b>	<b>42.6<sup>d</sup></b>	<b>54.6<sup>de</sup></b>	<b>64.4<sup>de</sup></b>	<b>8.1<sup>a</sup></b>	<b>24.0<sup>ab</sup></b>	<b>78.0<sup>ef</sup></b>
	$\pm 0.7$	$\pm 0.5$	$\pm 0.3$	$\pm 0.2$	$\pm 0.9$	$\pm 1.8$	$\pm 1.3$	$\pm 0.4$	$\pm 0.3$	$\pm 0.2$	$\pm 3.3$	$\pm 0.8$	$\pm 0.3$	$\pm 0.4$	$\pm 0.4$	$\pm 0.6$	$\pm 0.4$	$\pm 5.8$
<b>+0.1%GC</b>	<b>38.1<sup>a</sup></b>	<b>53.6<sup>ab</sup></b>	<b>64.2<sup>ab</sup></b>	<b>7.1<sup>cd</sup></b>	<b>31.0<sup>e</sup></b>	<b>61.4<sup>bcd</sup></b>	<b>39.0<sup>a</sup></b>	<b>54.0<sup>f</sup></b>	<b>65.0<sup>e</sup></b>	<b>6.1<sup>b</sup></b>	<b>30.1<sup>c</sup></b>	<b>52.8<sup>bcd</sup></b>	<b>39.8<sup>ab</sup></b>	<b>52.9<sup>ab</sup></b>	<b>62.6<sup>a</sup></b>	<b>8.5<sup>ab</sup></b>	<b>26.1<sup>bcd</sup></b>	<b>74.3<sup>bcd</sup></b>
	$\pm 0.2$	$\pm 0.4$	$\pm 0.8$	$\pm 1.2$	$\pm 0.5$	$\pm 6.6$	$\pm 0.4$	$\pm 0.2$	$\pm 0.2$	$\pm 0.6$	$\pm 0.4$	$\pm 2.2$	$\pm 0.2$	$\pm 0.8$	$\pm 0.2$	$\pm 1.2$	$\pm 1.9$	$\pm 6.3$
<b>+0.3%GG</b>	<b>39.9<sup>cd</sup></b>	<b>54.2<sup>bc</sup></b>	<b>65.3<sup>cd</sup></b>	<b>6.7<sup>bcd</sup></b>	<b>28.7<sup>cde</sup></b>	<b>55.8<sup>abc</sup></b>	<b>39.3<sup>a</sup></b>	<b>53.0<sup>abcd</sup></b>	<b>63.0<sup>ab</sup></b>	<b>6.0<sup>b</sup></b>	<b>27.5<sup>bc</sup></b>	<b>49.3<sup>ab</sup></b>	<b>42.0<sup>cd</sup></b>	<b>55.3<sup>e</sup></b>	<b>64.1<sup>cd</sup></b>	<b>8.2<sup>ab</sup></b>	<b>26.6<sup>cd</sup></b>	<b>67.9<sup>abc</sup></b>
	$\pm 0.3$	$\pm 0.6$	$\pm 0.6$	$\pm 0.2$	$\pm 1.7$	$\pm 5.7$	$\pm 1.0$	$\pm 0.2$	$\pm 0.4$	$\pm 0.4$	$\pm 2.2$	$\pm 3.5$	$\pm 0.6$	$\pm 0.4$	$\pm 0.1$	$\pm 0.5$	$\pm 1.1$	$\pm 5.3$
<b>+0.3%GA</b>	<b>40.3<sup>cd</sup></b>	<b>53.6<sup>ab</sup></b>	<b>63.6<sup>a</sup></b>	<b>7.6<sup>de</sup></b>	<b>26.5<sup>bc</sup></b>	<b>63.9<sup>cd</sup></b>	<b>39.0<sup>a</sup></b>	<b>52.7<sup>ab</sup></b>	<b>63.1<sup>ab</sup></b>	<b>7.2<sup>bcd</sup></b>	<b>27.3<sup>abc</sup></b>	<b>61.0<sup>ef</sup></b>	<b>42.5<sup>d</sup></b>	<b>54.4<sup>de</sup></b>	<b>64.1<sup>cd</sup></b>	<b>7.7<sup>a</sup></b>	<b>23.8<sup>ab</sup></b>	<b>64.9<sup>a</sup></b>
	$\pm 0.2$	$\pm 0.6$	$\pm 0.8$	$\pm 1.4$	$\pm 1.3$	$\pm 6.6$	$\pm 0.5$	$\pm 0.2$	$\pm 0.3$	$\pm 1.0$	$\pm 1.3$	$\pm 3.8$	$\pm 0.5$	$\pm 0.4$	$\pm 0.2$	$\pm 1.0$	$\pm 0.4$	$\pm 3.8$
<b>+0.3%GC</b>	<b>38.0<sup>a</sup></b>	<b>53.4<sup>ab</sup></b>	<b>63.8<sup>a</sup></b>	<b>6.5<sup>abcd</sup></b>	<b>30.7<sup>e</sup></b>	<b>55.4<sup>abc</sup></b>	<b>40.3<sup>ab</sup></b>	<b>53.3<sup>bcd</sup></b>	<b>63.1<sup>ab</sup></b>	<b>5.0<sup>a</sup></b>	<b>25.9<sup>ab</sup></b>	<b>43.4<sup>a</sup></b>	<b>39.4<sup>a</sup></b>	<b>52.3<sup>a</sup></b>	<b>62.7<sup>a</sup></b>	<b>8.7<sup>abc</sup></b>	<b>25.7<sup>abcd</sup></b>	<b>74.6<sup>cdef</sup></b>
	$\pm 0.5$	$\pm 0.4$	$\pm 0.6$	$\pm 0.7$	$\pm 0.4$	$\pm 4.0$	$\pm 1.0$	$\pm 0.9$	$\pm 0.7$	$\pm 0.6$	$\pm 3.6$	$\pm 7.6$	$\pm 0.2$	$\pm 1.0$	$\pm 0.5$	$\pm 0.8$	$\pm 2.0$	$\pm 4.9$
<b>+0.5%GG</b>	<b>42.2<sup>e</sup></b>	<b>54.0<sup>abc</sup></b>	<b>63.5<sup>a</sup></b>	<b>6.4<sup>abc</sup></b>	<b>23.6<sup>a</sup></b>	<b>51.2<sup>a</sup></b>	<b>41.2<sup>b</sup></b>	<b>53.1<sup>abcd</sup></b>	<b>63.0<sup>ab</sup></b>	<b>6.4<sup>bc</sup></b>	<b>23.7<sup>a</sup></b>	<b>51.2<sup>bc</sup></b>	<b>42.3<sup>d</sup></b>	<b>54.5<sup>de</sup></b>	<b>63.8<sup>bc</sup></b>	<b>8.0<sup>a</sup></b>	<b>24.4<sup>ab</sup></b>	<b>64.0<sup>a</sup></b>
	$\pm 0.6$	$\pm 0.5$	$\pm 0.4$	$\pm 0.3$	$\pm 1.2$	$\pm 1.7$	$\pm 0.5$	$\pm 0.2$	$\pm 1.2$	$\pm 0.3$	$\pm 0.6$	$\pm 1.7$	$\pm 0.3$	$\pm 0.2$	$\pm 0.3$	$\pm 0.1$	$\pm 1.1$	$\pm 1.0$
<b>+0.5%GA</b>	<b>40.9<sup>d</sup></b>	<b>53.5<sup>ab</sup></b>	<b>63.7<sup>a</sup></b>	<b>6.3<sup>abc</sup></b>	<b>25.3<sup>ab</sup></b>	<b>52.0<sup>a</sup></b>	<b>39.1<sup>a</sup></b>	<b>52.5<sup>a</sup></b>	<b>63.1<sup>ab</sup></b>	<b>6.5<sup>bcd</sup></b>	<b>26.7<sup>abc</sup></b>	<b>53.5<sup>bcd</sup></b>	<b>42.1<sup>d</sup></b>	<b>54.5<sup>de</sup></b>	<b>64.1<sup>cd</sup></b>	<b>7.9<sup>a</sup></b>	<b>24.9<sup>abc</sup></b>	<b>65.6<sup>ab</sup></b>
	$\pm 1.2$	$\pm 0.4$	$\pm 0.2$	$\pm 0.5$	$\pm 1.9$	$\pm 4.5$	$\pm 0.4$	$\pm 0.1$	$\pm 0.2$	$\pm 0.5$	$\pm 0.8$	$\pm 0.9$	$\pm 0.9$	$\pm 0.8$	$\pm 0.3$	$\pm 0.4$	$\pm 1.3$	$\pm 6.2$
<b>+0.5%GC</b>	<b>38.3<sup>ab</sup></b>	<b>53.3<sup>a</sup></b>	<b>63.5<sup>a</sup></b>	<b>6.4<sup>abc</sup></b>	<b>29.9<sup>de</sup></b>	<b>53.9<sup>ab</sup></b>	<b>39.1<sup>a</sup></b>	<b>53.2<sup>abcde</sup></b>	<b>63.1<sup>ab</sup></b>	<b>6.3<sup>bc</sup></b>	<b>28.1<sup>bc</sup></b>	<b>52.7<sup>bcd</sup></b>	<b>39.7<sup>ab</sup></b>	<b>53.3<sup>abc</sup></b>	<b>64.1<sup>cd</sup></b>	<b>8.7<sup>abc</sup></b>	<b>27.1<sup>cd</sup></b>	<b>72.4<sup>bcd</sup></b>
	$\pm 0.8$	$\pm 0.2$	$\pm 0.7$	$\pm 0.4$	$\pm 1.4$	$\pm 6.5$	$\pm 0.5$	$\pm 1.0$	$\pm 0.8$	$\pm 0.3$	$\pm 2.5$	$\pm 4.7$	$\pm 0.3$	$\pm 0.5$	$\pm 0.3$	$\pm 1.0$	$\pm 0.6$	$\pm 2.8$
<b>MPA</b>	<b>38.5<sup>ab</sup></b>	<b>53.5<sup>ab</sup></b>	<b>65.0<sup>bc</sup></b>	<b>8.3<sup>e</sup></b>	<b>30.1<sup>de</sup></b>	<b>70.2<sup>d</sup></b>	<b>39.7<sup>a</sup></b>	<b>53.7<sup>def</sup></b>	<b>65.0<sup>e</sup></b>	<b>8.2<sup>f</sup></b>	<b>27.9<sup>bc</sup></b>	<b>69.4<sup>g</sup></b>	<b>40.6<sup>b</sup></b>	<b>53.7<sup>bcd</sup></b>	<b>64.2<sup>cd</sup></b>	<b>9.2<sup>bcd</sup></b>	<b>26.1<sup>bcd</sup></b>	<b>77.4<sup>def</sup></b>
<b>20%</b>	$\pm 0.5$	$\pm 0.4$	$\pm 0.6$	$\pm 0.5$	$\pm 0.1$	$\pm 2.0$	$\pm 0.5$	$\pm 0.1$	$\pm 0.1$	$\pm 0.2$	$\pm 1.1$	$\pm 1.4$	$\pm 0.4$	$\pm 0.2$	$\pm 0.1$	$\pm 0.5$	$\pm 1.2$	$\pm 6.5$
<b>+0.1%GC</b>	<b>39.3<sup>bc</sup></b>	<b>53.3<sup>a</sup></b>	<b>63.9<sup>a</sup></b>	<b>7.3<sup>cde</sup></b>	<b>28.1<sup>cd</sup></b>	<b>58.0<sup>abc</sup></b>	<b>39.3<sup>a</sup></b>	<b>53.2<sup>abcde</sup></b>	<b>63.8<sup>bcd</sup></b>	<b>8.1<sup>ef</sup></b>	<b>27.8<sup>bc</sup></b>	<b>64.1<sup>fg</sup></b>	<b>40.3<sup>ab</sup></b>	<b>53.8<sup>bcd</sup></b>	<b>63.8<sup>bc</sup></b>	<b>8.7<sup>abc</sup></b>	<b>27.0<sup>cd</sup></b>	<b>68.9<sup>abcd</sup></b>
	$\pm 0.4$	$\pm 0.5$	$\pm 0.6$	$\pm 0.3$	$\pm 0.8$	$\pm 3.2$	$\pm 0.6$	$\pm 0.2$	$\pm 0.1$	$\pm 0.4$	$\pm 1.1$	$\pm 3.2$	$\pm 0.6$	$\pm 0.9$	$\pm 0.6$	$\pm 0.4$	$\pm 1.2$	$\pm 3.6$
<b>+0.3%GC</b>	<b>39.3<sup>bc</sup></b>	<b>53.2<sup>a</sup></b>	<b>63.3<sup>a</sup></b>	<b>7.6<sup>de</sup></b>	<b>27.8<sup>cd</sup></b>	<b>52.8<sup>ab</sup></b>	<b>39.4<sup>a</sup></b>	<b>52.9<sup>abc</sup></b>	<b>63.7<sup>abcd</sup></b>	<b>7.4<sup>def</sup></b>	<b>27.1<sup>abc</sup></b>	<b>51.4<sup>bcd</sup></b>	<b>39.7<sup>ab</sup></b>	<b>53.3<sup>abc</sup></b>	<b>63.4<sup>b</sup></b>	<b>9.8<sup>d</sup></b>	<b>27.1<sup>d</sup></b>	<b>67.8<sup>abc</sup></b>
	$\pm 0.5$	$\pm 0.1$	$\pm 0.6$	$\pm 0.4$	$\pm 1.1$	$\pm 5.8$	$\pm 0.8$	$\pm 0.2$	$\pm 0.1$	$\pm 0.3$	$\pm 1.5$	$\pm 5.9$	$\pm 0.5$	$\pm 0.3$	$\pm 0.4$	$\pm 0.4$	$\pm 0.5$	$\pm 7.4$
<b>+0.5%GC</b>	<b>38.8<sup>ab</sup></b>	<b>53.6<sup>ab</sup></b>	<b>64.0<sup>ab</sup></b>	<b>8.3<sup>e</sup></b>	<b>29.6<sup>de</sup></b>	<b>55.6<sup>abc</sup></b>	<b>40.4<sup>ab</sup></b>	<b>53.9<sup>ef</sup></b>	<b>64.2<sup>cde</sup></b>	<b>6.2<sup>b</sup></b>	<b>27.1<sup>abc</sup></b>	<b>41.8<sup>a</sup></b>	<b>39.8<sup>ab</sup></b>	<b>53.3<sup>abc</sup></b>	<b>63.5<sup>b</sup></b>	<b>9.7<sup>cd</sup></b>	<b>27.0<sup>d</sup></b>	<b>65.0<sup>a</sup></b>
	$\pm 0.6$	$\pm 0.5$	$\pm 0.6$	$\pm 0.3$	$\pm 1.2$	$\pm 0.7$	$\pm 1.1$	$\pm 0.6$	$\pm 0.7$	$\pm 0.5$	$\pm 1.1$	$\pm 4.4$	$\pm 0.3$	$\pm 0.7$	$\pm 0.3$	$\pm 0.3$	$\pm 1.0$	$\pm 2.6$

$T_0$ : temperatura inicial,  $T_p$ : temperatura de pico,  $T_c$ : temperatura de conclusão,  $\Delta H_{ret}$ : entalpia de retrogradação,  $R_{ret}$ : faixa temperatura de retrogradação 2 ( $T_p - T_0$ ),  $R$ : % retrogradação ( $\Delta H_{ret} / \Delta H_{gel}$ ). Os valores apresentados correspondem à média de três ensaios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto às temperaturas de transição ( $T_0$ ,  $T_p$  e  $T_c$ ) obtidas, as  $T_0$  quer após 7 dias quer após 40 dias de armazenamento foram superiores para os géis mistos com a GG e GA e inferiores com a GC (esta ultima não diferindo dos controlos). Após 14 dias de armazenamento não houve diferença entre as gomas e os controlos. Observa-se a tendência do aumento nas  $T_0$  com o tempo de armazenamento. Analisando as outras temperaturas de transição, em geral, quer as  $T_p$  quer as  $T_c$  não apresentaram alteração após 7 dias de armazenamento com pequena variação após este período, principalmente nos géis com a GG e GC (diminuição e aumento após 14 e 40 dias, respetivamente).

Nos géis mistos com as galactomananas as faixas de temperaturas de retrogradação ( $R_{ret}$ ) diminuíram com o tempo de armazenamento principalmente entre 7 e 40 dias (semelhantemente aos controlos) sendo na sua maioria menores para os géis com as GG e GA do que com a GC. As entalpias de retrogradação ( $\Delta H_{ret}$ ) quer para os controlos quer para os géis mistos tenderam ao aumento com o tempo de armazenamento, principalmente após os 40 dias. Avaliando-se a maior concentração adicionada das galactomananas (0.5%), as  $\Delta H_{ret}$  não apresentaram diferença significativa entre as gomas ou com relação aos controlos.

Com relação à percentagem de retrogradação ( $R$ ), após os 7 e 14 dias de armazenamento não observou-se redução da retrogradação dos géis de amido com as galactomananas em relação ao gel controlo (amido COM). Neste período, como pode-se observar a 0.5%, também não houveram diferenças significativas entre as gomas em estudo. Entretanto, a análise após os 40 dias demonstrou a ocorrência de auxílio na estabilidade dos géis de amido (decréscimo significativo da  $R$ ). Este decréscimo na retrogradação foi observado nos géis mistos a partir de 0.3% para a GG e GA, ao passo que a GC não diferiu significativamente do controlo. Estes resultados demonstram que as galactomananas com estruturas mais ramificadas ajudaram a controlar a reassociação das cadeias de amilopectina, no entanto este efeito foi dependente da concentração e do tempo.

Com o amido MPA foram analisados os géis mistos com a GC a 0.1, 0.3 e 0.5% de concentração e ao longo do tempo. Neste amido a inibição da retrogradação com a GC foi consideravelmente efetiva já na primeira semana de armazenamento (sem diferenças

entre as concentrações adicionadas). Após 14 e 40 dias a *R* diminuiu significativamente em relação ao controlo com a adição de 0.3 e 0.5% da goma. A diferença observada no controlo da retrogradação com a goma cassia entre os dois amidos (COM e MPA) reflete e está correlacionada com as associações que ocorreram durante a gelatinização. Estes resultados estão em acordo com o trabalho desenvolvido por Ferrero *et al.* (1996) que argumentam que diferenças na desintegração dos grânulos de amido podem ser a causa de maior ou menor quantidade de amilopectina exposta, o que afeta a associação entre o amido e outros biopolímeros. Estes pesquisadores trabalharam com o DSC (amido de milho e xantana) e correlacionaram o facto de que a goma não preveniu a retrogradação da amilopectina devido a não desintegração granular que foi observada por microscopia. Com menos amilopectina fora do grânulo, onde a goma atua, a possibilidade de interação entre os biopolímeros torna-se limitada.

Infere-se que a habilidade das galactomananas em controlar a retrogradação das cadeias de amido implica associação entre os biopolímeros. Se este controlo fosse principalmente devido à capacidade de ligação com a água este fator poderia até mesmo aumentar a retrogradação da amilopectina pensando em termos de maior concentração de cadeias deste polímero, além de que qualquer hidrocolóide deveria desta maneira ser capaz de reduzir a retrogradação.

### 4.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, analisou-se o efeito de diferentes galactomananas, nomeadamente a goma guar (GG), a de alfarroba (GA) e a cassia (GC), sobre os processos de gelatinização e retrogradação do amido. A caracterização das galactomananas confirmou o já esperado quanto às diferenças com relação à razão M/G em suas estruturas (fator que fomentou a seleção das mesmas para este estudo) sendo, portanto, a GG mais ramificada do que a GA e do que a GC. O mesmo foi verificado quanto à  $M_v$  e  $[\eta]$ :  $GG > GA > GC$ . Nas análises reológicas foi verificado que as galactomananas apresentaram efeito na formação dos géis de amido, dependendo quer do tipo e concentração de galactomanana adicionada, quer da variedade de amido utilizada. De uma forma geral, as galactomananas elevaram a temperatura do início do processo de gelatinização, observando-se a maior TG



para 0.3% (GG > GA > GC) e início de um decréscimo acima de 0.5% (GC > GA > GG), interligadas com a homogeneidade dos sistemas mistos influenciada pela  $[\eta]$  das gomas. Durante o aquecimento o desenvolvimento do  $G'$  (inchamento granular, lixiviação da amilose e desenvolvimento da rede polimérica) apresentou curvas bastante similares entre os sistemas de amidos e mistos, com uma diminuição pouco intensa a 0.3% e elevação a 0.5% com relação aos controlos (associada à predominância de interações entre os polímeros do mesmo tipo, amido-amido/goma-goma; GG > GA > GC). Em geral, a temperatura de pico (TP) não foi influenciada pela presença das galactomananas (requerimento da mesma energia para o início da rutura da estrutura granular do amido). No arrefecimento a temperatura para o início do restabelecimento da rede polimérica foi semelhante entre os amidos isoladamente e adicionados das galactomananas. As galactomananas contribuíram para a formação da rede polimérica, resultando em um melhor desenvolvimento do  $G'$  com relação aos controlos. Infere-se que houve influência da razão de M/G nesta contribuição (GG > GA > GC) e que diferenças estruturais entre os amidos também contribuíram neste parâmetro. Esta diferença foi refletida nos espectros mecânicos que demonstraram através da  $\tan \delta$  uma alteração diferenciada na viscoelasticidade dos géis entre os dois amidos. Em geral as galactomananas aumentaram o carácter viscoso para ambos os géis de amido com maior modificação para os géis mistos com o amido COM. Houve dependência da concentração das gomas porém, não se observou correlação linear com o tipo das galactomananas na alteração da viscoelasticidade dos géis. Nos ensaios de maturação foi observado que a presença das gomas auxiliou para um desenvolvimento mais rápido e mais intenso dos géis, sem diferença significativa entre as gomas, que pode ser atribuído à maior interação entre as cadeias de amilose devido à presença das galactomananas. A alteração na viscoelasticidade dos géis de amido ocasionada pelas gomas foi correlacionada com as microestruturas obtidas por CLSM (formação de microestruturas diferenciadas entre as variedades de amido e consoante a concentração e tipo de galactomanana) entendendo-se apresentar conexão com uma descontinuidade entre as cadeias de amido pela presença das gomas.

Através do MID-IR foi possível observar o efeito da adição das galactomananas na gelatinização dos dois amidos, COM e MPA. No caso da gelatinização do amido MPA é visível o aumento de sinais na zona de estiramento das ligações C-H dos grupos  $\text{CH}_2$

(2921  $\text{cm}^{-1}$ ), o qual é também refletido nos picos de 1453, 1412 e 1366  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes à deformações de C-H. Associou-se este aumento a um aumento na mobilidade dos grupos  $\text{CH}_2$  durante a gelatinização e lixiviação dos componentes do amido. Podemos relacionar esta observação com o facto da presença das galactomananas levarem a um aumento do módulo elástico durante o processo de gelatinização, com maior evidência no caso das misturas com o MPA. Foi observado um comportamento invulgar na concentração 0.3% da goma de alfarroba, a qual origina um aumento notável de todos estes picos nos dois amidos. Este aumento pode não ser devido exclusivamente a um aumento da mobilidade do amido mas também da goma. É de salientar que os valores de recuperação relativa de estrutura (RRE) durante o arrefecimento para o sistema misto COM + GA 0.3% é mais baixo do que o controlo do amido. A diminuição da intensidade das bandas na zona dos 1000  $\text{cm}^{-1}$  pode ser associada à diminuição das ligações de hidrogénio no amido. Com os dados atuais não é possível especular mais sobre os fenómenos subjacentes a este comportamento, contudo a técnica de infravermelho parece ser um auxiliar valioso na monitorização das modificações ocasionadas pela gelatinização e a sua interação com outros polissacarídeos.

As análises térmicas também demonstraram alteração nos parâmetros que envolvem os processos de gelatinização e retrogradação do amido com a adição das galactomananas. Na gelatinização foi verificado o aumento da  $T_0$  com relação aos controlos sem diferenças significativas com relação à concentração e entre as gomas. O aumento observado nas entalpias de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ) sugere a ocorrência de associação entre as cadeias de amilopectina e as galactomananas como fator responsável pela maior energia necessária para a gelatinização (dependente do amido). Quanto à retrogradação do amido foi observado que no período entre 1 e 2 semanas nos géis mistos com o amido COM as diferenças estruturais e de concentração das galactomananas não tiveram um considerável efeito no controlo da retrogradação deste amido. Somente após 40 dias as gomas GG e GA (mais ramificadas e acima de 0.3%) foram eficientes em reduzir a percentagem de retrogradação. Com o amido MPA a GC foi capaz de inibir a retrogradação deste amido logo na primeira semana de armazenamento. Assim, o controlo da retrogradação foi dependente da concentração das gomas, do tipo, do tempo e do amido.





## ***Capítulo 5-* Conclusões Finais e Sugestões para Trabalhos Futuros**

---



Nesta tese foi analisada a fração de amido isolada de seis variedades de milho crioulo, provenientes do Brasil, os quais foram comparados com um amido comercial. Utilizando-se formulações de sistemas mistos também foram analisados os efeitos que outros biopolímeros ocasionam nos processos de gelatinização e retrogradação do amido, nomeadamente a quitosana e diferentes galactomananas (goma guar, goma de alfarroba e goma cassia).

A caracterização dos amidos ao nível de composição química revelou grande similaridade entre os mesmos. Tratam-se de amidos normais quanto aos teores de seus componentes maioritários, com teor de amilose determinado entre 25 e 28%. Os grânulos são heterogêneos quanto ao tamanho e forma. Os amidos das variedades MT e PIR foram os que apresentaram maior e menor poder de inchamento, respetivamente, quer a 65 °C quer a 90 °C. Através das análises térmicas (DSC) foi possível a obtenção de parâmetros importantes para a potencial aplicação destes amidos. Nesta análise o amido da variedade MT destacou-se com a menor temperatura de início do processo de gelatinização ( $T_0$ ) e o amido da variedade MPA com a maior. O estudo da retrogradação, realizado após armazenamento dos géis durante 7, 14 e 40 dias sob refrigeração a 4 °C, demonstrou que o amido da variedade MPA é o menos estável, ou seja, foi o que apresentou maior percentagem de retrogradação nos três períodos de tempo analisados. As diferenças obtidas para os amidos na análise térmica indicam relação com diferenças na estrutura dos amidos. Através da espectroscopia de infravermelho foi observado que a humidade do ambiente de análise interfere nas bandas espectrais localizadas a 1643 e 999  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que a diferença entre estas intensidades pode ser utilizada como uma possível estimativa da capacidade de absorção de água pelo grânulo. No estudo do comportamento reológico foram observadas as alterações nas propriedades viscoelásticas durante os processos de gelatinização e retrogradação e que resultou na formação de géis quer a 10% quer a 20% de concentração de amido. Nesta análise foi observada a influência da concentração (aumento dos módulos com a concentração do sistema e diminuição das temperaturas de início do processo de gelatinização) e também da estrutura granular nos perfis reológicos dos amidos. As curvas obtidas durante o aquecimento demonstram que as ligações de hidrogénio, existentes entre os componentes macromoleculares do amido, rompem-se com maior facilidade nos amidos crioulos quando comparados ao amido comercial, resultando em menores  $G'_{\text{máx}}$  e menores temperaturas de pico. Durante o arrefecimento a estruturação foi influenciada por estas

diferentes extensões de desintegração granular e lixiviação da amilose e da amilopectina, para além de ser observada a influência negativa dos grânulos remanescentes na agregação das moléculas de amilose (dependente da concentração do sistema). Através dos espectros mecânicos observou-se a formação de géis fracos a 10% de concentração de amido, com ocorrência de rearranjos moleculares, e a 20% houve a formação de uma estrutura mais rígida traduzindo-se em géis fortes. Os géis de todos os amidos em estudo apresentaram predominância evidente do carácter elástico com valores dos módulos viscoelásticos bastante semelhantes. Assim, verificou-se que a fração amido das variedades de milho crioulo estudadas apresenta qualidade e equivalência ao amido comercial podendo-se desta forma inseri-los como matéria-prima a nível industrial, de acordo com suas particularidades. Sugere-se para trabalhos futuros que após a seleção de diferentes variedades de milho crioulo, faça-se o isolamento da fração amido e de seguida aplique-se a análise multivariada (PCA) para que assim, num primeiro momento, possa-se tentar distinguir possíveis variedades com esta fração diferenciada.

Com relação à adição da quitosana e das galactomananas em sistemas mistos com o amido verificou-se alterações nos processos de gelatinização e retrogradação do amido na presença destes hidrocolóides.

No caso da quitosana, nas análises reológicas, este biopolímero conduziu a um aumento da temperatura de gelatinização que foi atribuído à competição pela água do sistema entre os biopolímeros, para além da viscosidade conferida pela quitosana, diminuindo a mobilidade dos grânulos e consequentemente resultando no aumento da temperatura necessária para o início deste processo. Este aumento da temperatura de gelatinização devido à presença da quitosana foi confirmado pela calorimetria diferencial de varrimento. A quitosana também dificultou a lixiviação da amilose, durante o ciclo de aquecimento, restringindo o desenvolvimento do módulo elástico ( $G'$ ) e aumentando a temperatura de início da rutura granular. A estruturação durante o arrefecimento também foi alterada. Esta ocorreu para menores temperaturas e no meio acidificado com ácido acético 1 mol/L a quitosana contribuiu para o aumento do módulo elástico, ao contrário do que ocorreu a 0,1 mol/L de ácido acético. Em relação às características viscoelásticas finais dos géis foi observado o aumento do carácter elástico (auxílio na firmeza dos géis), em comparação com o controlo, quando os sistemas mistos foram gelatinizados em 1 mol/l de



ácido acético e a não alteração significativa do comportamento viscoelástico, com relação ao controlo, quando a gelatinização foi realizada em ácido acético 0,1 mol/L. O MID-IR demonstrou que ocorreu a formação de complexos entre o amido e o ácido acético, os quais diminuem com a presença da quitosana. Para além disto verificou-se a ausência da banda referente ao  $\text{NH}_3^+$  que deveria estar localizada a  $1514\text{ cm}^{-1}$ . Esta observação foi interpretada como a indicação de uma possível interação entre o ácido acético e a quitosana formando acetato de quitosana e, remetendo que este polímero está atuando como sem carga. Na região espectral da banda da amina foi observado um deslocamento nos números de onda que ocorreu com a mesma magnitude para todos os sistemas mistos. Assim, pode-se concluir que as diferenças na viscoelasticidade dos géis de amido com quitosana, observadas no meio mais ácido no qual o amido sofreu alguma hidrólise, apontam ser provenientes de uma organização diferenciada entre os biopolímeros na rede dos géis. Através das análises térmicas foi observado que a quitosana modifica as temperaturas de transição de fase do amido e que com relação à retrogradação ao longo do tempo e sob refrigeração não ocorre efeito, com a quitosana a não contribuir significativamente para diminuir o processo de retrogradação.

No caso das galactomananas a caracterização das gomas confirmou as diferenças estruturais quanto à razão manose/galactose (M/G) ( $\text{GG} > \text{GA} > \text{GC}$ ) sendo a mesma relação verificada quanto à massa molecular viscosimétrica e à viscosidade intrínseca. Nas análises reológicas estes biopolímeros também demonstraram aumentar a temperatura de início do processo de gelatinização até 0.3% de concentração e o início de um decréscimo iniciou com 0.5% (confirmado pela calorimetria diferencial de varrimento). Nestes sistemas mistos pouca variação foi observada com relação ao desenvolvimento de  $G'$  durante o aquecimento no reómetro em comparação com os controlos (inchamento granular, lixiviação da amilose e desenvolvimento da rede polimérica), entretanto a 0.5% de concentração foi observado um aumento que foi associado à predominância de interações entre os polímeros do mesmo tipo ( $\text{GG} > \text{GA} > \text{GC}$ ). Não foi observada diferença significativa na temperatura de início da rutura granular. No arrefecimento, a estruturação dos polímeros não apresentou diferença na temperatura deste início e foi verificado que as galactomananas contribuíram para a formação da rede polimérica, resultando em um melhor desenvolvimento do  $G'$  com relação aos controlos ( $\text{GG} > \text{GA} >$

GC), havendo diferença entre os amidos (maior desenvolvimento nos sistemas mistos do amido MPA). Nas características viscoelásticas finais dos géis foi observado que as galactomananas ocasionaram aumento do carácter viscoso para ambos os géis de amido com maior modificação para os géis mistos com o amido COM. Esta alteração foi dependente da concentração das gomas não se observando correlação com as diferenças estruturais do polissacarídeo. Através da microscopia confocal foi possível verificar a formação de microestruturas diferenciadas entre as variedades de amido e consoante a concentração e tipo de galactomanana, entendendo-se apresentar conexão com uma descontinuidade entre as cadeias de amido pela presença das gomas. Nas análises térmicas foi observado que as galactomananas modificaram as temperaturas de transição de fase do amido e o aumento observado nas entalpias de gelatinização foram interpretados como resultado de alguma associação entre as cadeias de amilopectina e as galactomananas (dependente do amido). Com relação à retrogradação ao longo do tempo e sob refrigeração ocorreu auxílio das galactomananas no controlo deste processo, dependente da concentração das gomas, do tipo, do tempo e do amido. Esta diminuição da retrogradação foi observada somente após 40 dias sob refrigeração e nos géis do amido COM com as gomas guar e de alfarroba, acima de 0.3%. No amido MPA a goma cassia foi capaz de inibir a retrogradação deste amido logo na primeira semana de armazenamento. Como sugestões para trabalhos futuros em relação às galactomananas há muito para ser pesquisado e, com a quitosana sugere-se estudar o assunto do papel do ácido e a carga da molécula. No entanto, os resultados obtidos contribuem para um melhor conhecimento de sistemas macromoleculares mistos onde o amido está presente e podem contribuir para o desenvolvimento de novas formulações para obtenção de texturas desejadas em sistemas alimentares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdorreza, M. N.; Robal, M.; Cheng, L. H.; Tajul, A. Y.; Karim, A. A. (2012). **Physicochemical, thermal, and rheological properties of acid-hydrolyzed sago (*Metroxylon sagu*) starch.** *LWT - Food Science and Technology*, 46, 135-141.
- Achayuthakan, P.; Supphantharika, M. (2008). **Pasting and rheological properties of waxy corn starch as affected by guar gum and xanthan gum.** *Carbohydrate Polymers*, 71, 9-17.
- Ahmad, F. B.; Willians, P. A. (1998). **Rheological properties of sago starch.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 4060-4065.
- Ahmad, F. B.; Williams, P. A. (2001). **Effect of galactomannans on the thermal and rheological properties of sago starch.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 578-1586.
- Ahmed, J.; Ramaswamy, H. S.; Ayad, A.; Alli, I. (2008). **Thermal and dynamic rheology of insoluble starch from basmati rice.** *Food Hydrocolloids*, 22, 278-287.
- Ahmed, J.; Auras, R. (2011). **Effect of acid hydrolysis on rheological and thermal characteristics of lentil starch slurry.** *LWT - Food Science and Technology*, 44, 976-983.
- Aider, M. (2010). **Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review.** *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- Arocas, A.; Sanz T.; Fiszman, S. M. (2009). **Improving effect of xanthan and locust bean gums on the freeze-thaw stability of white sauces made with different native starches.** *Food Hydrocolloids*, 23, 2478-2484.
- Alvarenga, E. S.; Oliveira, C. P.; Belato, C. R. (2010). **An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan.** *Carbohydrate Polymers*, 80, 1155-1160.
- Allonce, M.; Lefebvre, J.; Llamas, G.; Doublier, J. L. (1989). **A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures.** *Cereal Chemistry*, 66, 90-93.
- American Association of Cereal Chemists. (1995). **Official Methods of the American Association of Cereal Chemists.** AACC, St Paul, Minnesota.
- Ando, H.; Tang, H.; Watanabe, K.; Mitsunaga, T. (2002). **Some physicochemical**

- properties of large, medium and small granule starches in fractions of wheat grain.** *Food Science Technology Research*, 8, 24-27.
- Appelqvist, I. A. M.; Debet, M. R. M. (1997). **Starch-biopolymer interactions – A review.** *Food Reviews International*, 13, 163-224.
- Arockianathan, P. M.; Sekar, S.; Kumaran, B.; Sastry, T. P. (2012). **Preparation, characterization and evaluation of biocomposite films containing chitosan and sago starch impregnated with silver nanoparticles.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 939-946.
- Association of Official Analytical Chemists. (1995). **Official Methods of Analysis.** AOAC, 16th ed.; Gaithersburg, USA.
- Ávila, A.; Bierbrauer, K.; Pucci, G.; López-González, M.; Strumia, M. (2012). **Study of optimization of the synthesis and properties of biocomposite films based on grafted chitosan.** *Journal of Food Engineering*, 109, 752-761.
- Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Fook, M. V. L.; Costa, A. C. F. M. (2007). **Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais.** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 23, 27-34.
- Bahrani, S. A.; Loisel, C.; Rezzouga, S.; Doublier, J.; Rezzouga, Z. (2012). **Role of vacuum steps added before and after steaming treatment of maize starch. Impact on pasting, morphological and rheological properties.** *Carbohydrate Polymers*, 89, 810-820.
- Bahrani, S. A.; Loisel, C.; Rezzouga, Z.; Valle, D. D.; Rezzouga, S. (2013). **Rheological and viscoelastic properties of corn starch suspension modified by hydrothermal process: Impacts of process intensification.** *Chemical Engineering and Processing*, 64, 10-16.
- Baldwin, P. M. (2001). **Starch granule-associated proteins and polypeptides: A review.** *Starch/Stärke*, 53, 475-503.
- Banks, W.; Greenwood, C. T. (1975). **Starch and its components.** Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Barker, S. A.; Bourne, E. J.; Stephens, R.; Whiffen, D. H. (1995). **Infra-red spectra of carbohydrates. Part II. Anomeric configuration of some hexo- and pentopyranoses.** *Journal of the Chemical Society*, 3468-3473.
- Barros, A. (1999). **Contribution a la selection et la comparaison de variables**

- características.** Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, *PhD Thesis*.
- BeMiller, J. N. (2011). **Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations.** *Carbohydrate Polymers*, 86, 386-423.
- Bertoft, E. (2004). **Analysing Starch Structure.** In: Eliasson, A. C. (Ed.). *Starch in food: Structure, function and applications*. New York: CRC Press, p.57-96.
- Biliaderis, C. G.; Arvanitoyannis, I.; Izydorczyk, M. S.; Prokopowich, D. J. (1997). **Effect of hydrocolloids on gelatinization and structure formation in concentrated waxy maize and wheat starch gels.** *Starch/Stärke*, 49, 278-283.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bonilla, J.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. (2013). **Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition.** *Journal of Food Engineering*, 114, 303-312.
- Bourtoom, T.; Chinnan, M. S. (2008). **Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film.** *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1633-1641.
- Brasil. Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. **Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.** (1978). *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, p.20.
- Brennan, C. S.; Suter, M.; Matia-Merino, L.; Luethi, T.; Ravindran, G.; Goh, K.; Ovortrup, J. (2006). **Gel and pasting behaviour of fenugreek-wheat starch and fenugreek-wheat flour combinations.** *Starch/Stärke*, 58, 527-535.
- Burey, P.; Bhandari, B. R.; Rutgers, R. P. G.; Halley, P. J.; Torley, P. J. (2009). **Confectionary gel: a review on formulation, rheological and structural aspects.** *International Journal of Food Properties*, 12, 176-210.
- Cai, X.; Hong, Y.; Gu, Z.; Zhang, Y. (2011). **The effect of electrostatic interactions on pasting properties of potato starch/xanthan gum combinations.** *Food Research International*, 44, 3079-3086.
- Canci, A., Vogt, G. A., Canci, I., (2004). **A diversidade das espécies crioulas em Anchieta - SC: diagnóstico, resultado de pesquisa e outros apontamentos para a conservação da agrobiodiversidade.** *McLee*, 108p.
- Cereda, M. P.; Franco, C. M. L.; Daiuto, E. R.; Demiante, I. M.; Carvalho, L. J. C. B.;

- Leonel, M.; Vilpoux, O. V.; Sarmiento, O. S. B. S. (2002). **Propriedades gerais do amido** (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas). São Paulo: *Fundação Cargill*, v.1, 221p.
- Cerná, M.; Barros, A. S.; Nunes, A.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Copíková, J.; Coimbra, M. A. (2003). **Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives.** *Carbohydrate Polymers*, 51, 383-389.
- Cerqueira, M. A.; Souza, B. W. S.; Simões, J.; Teixeira, J. A.; Domingues, M. R. M.; Coimbra, M. A.; Vicente, A. A. (2011). **Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources.** *Carbohydrate Polymers*, 83, 179-185.
- Chaisawang, M.; Supphantharika, M. (2005). **Effects of guar gum and xanthan gum additions on physical and rheological properties of cationic tapioca starch.** *Carbohydrate Polymers*, 61, 288-295.
- Chaisawang, M.; Supphantharika, M. (2006). **Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum.** *Food Hydrocolloids*, 20, 641-649.
- Chantaro, P.; Pongsawatmanit, R.; Nishinari, K. (2013). **Effect of heating-cooling on rheological properties of tapioca starch paste with and without xanthan gum.** *Food Hydrocolloids*, 31, 183-194.
- Choi, H.; Yoo, B. (2008). **Rheology of mixed systems of sweet potato starch and galactomannans.** *Starch/Stärke*, 60, 263-269.
- Chung, H.; Hoover, R.; Liu, Q. (2009). **The impact of single and dual hydrothermal modifications on the molecular structure and physicochemical properties of normal corn starch.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 203-210.
- Ciucanu, I.; Kerek, F. (1984). **A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.** *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.
- Coimbra, M. A.; Ferreira, Mafra, I.; Ferreira, D.; Cardoso, S.; Domingues, M. R.; Nunes, F. M.; Barros, A.; Delgadillo, I. (2004). **Estrutura de polissacarídeos.** In: Melo, J. S. S.; Moreno, M. J.; Burrows, H. D.; Gil, M. H. (Eds.). *Química de Polímeros*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, p.591-618.
- Coimbra, M. A.; Delgadillo, I.; Waldron, K. W.; Selvendran, R. R. (1996). **Isolation and**

- analysis of cell Wall polymers from olive pulp.** In: Linskens, H. F.; Jackson, J. F. (Eds.), *Modern methods of plant analysis*, 17, 19-44. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Collado, L. S.; Corke, H. (2003). **Starch properties and functionalities.** In: Kaletunç, G.; Breslauer, K. J. (Eds.). *Characterization of cereals and flours: Properties, analysis and applications*. New York: Taylor & Francis, p.473-506.
- Cooke, D.; Gidley, M. J. (1992). **Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization and origin of the enthalpic transition.** *Carbohydrate Research*, 227, 103-112.
- Copeland, L.; Blazek, J.; Salman, H.; Tang, M. T. (2009). **Form and functionality of starch.** *Food Hydrocolloids*, 23, 1527-1534.
- Copíková, J.; Barros, A. S.; Smídová, I.; Cerná, M.; Teixeira, D. H.; Delgadillo, I.; Synytsya, A.; Coimbra, M. A. (2006). **Influence of hydration of food additive polysaccharides on FT-IR spectra distinction.** *Carbohydrate Polymers*, 63, 355-359.
- Correa, C.; Weid, J. M. V. D. (2006). **Variedades crioulas na lei de sementes. Avanços e impasses.** *Agriculturas*, 3, 11-14.
- Correa, C.; Monteiro, D.; Burg, I. C.; Evangelista, J.; Neto, M. A. (2007). **Uso e conservação da biodiversidade.** *Caderno do II encontro anual de agroecologia*, 69p.
- Costa, J. M.; Scher, J.; Hardy, J. (2003). **Influência do nível de hidratação na distribuição granulométrica de farinhas de trigo: uso da técnica de difração laser.** *Revista Ciência Agronômica*, 34, 173-177.
- Closs, C. B.; Conde-Petit, B.; Roberts, I. D.; Tolstoguzov, V. B.; Escher, F. (1999). **Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems.** *Carbohydrate Polymers*, 39, 67-77.
- Czubenko, J. O.; Druzynska, M. G. (2009). **Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes.** *Carbohydrate Polymers*, 77, 590-598.
- Daiuto, E. R. (2005). **Características de féculas de tuberosas e suas relações com resistências dos géis sob condições de estresse aplicada na industrialização de alimentos.** *Tese (Doutorado em Agronomia)*, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 146p.

- Damian, C.; Beirão, L. H.; de Francisco, A.; Santo, M. L. P. E.; Teixeira, E. (2005). **Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais.** *Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 16, 195-205.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. (2011). **Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications.** *Progress in Polymer Science*, 36, 981-1014.
- de Vasconcelos, C. L.; Bezerril, P. M.; dos Santos, D. E. S.; Dantas, T. N. C.; Pereira, M. R.; J Fonseca, L. C. (2006). **Effect of molecular weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly (methacrylic acid) and chitosan.** *Biomacromolecules*, 7, 1245-1252.
- Denardin, C. C.; Silva, L. P. (2009). **Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas.** *Ciência Rural*, 39, 945-954.
- Dombrink-Kurtzman, M. A.; Knutson, C. A. (1997). **A study of maize endosperm hardness in relation to amylase content and susceptibility to damage.** *Cereal Chemistry*, 74, 776-780.
- Doublier, J. L.; Launay, B. (1981). **Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum.** *Journal of Texture Studies*, 12, 151-172.
- dos Santos, J. E.; Soares, J. P.; Dockal, E. R. (2003). **Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 242-249.
- Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, J. (2009). **Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications.** *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Eliasson, A. C.; Gudmundsson, M. (2006). **Starch: physicochemical and functional aspects.** In: Eliasson, A. C. (Ed.). *Carbohydrates in Foods*. New York: CRC Press, p.391-469.
- El-hefian, E. A.; Yahaya, A. H. (2010). **Rheological study of chitosan and its blends: An overview.** *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4, 210-220.
- El-hefian, E. A.; Elgannoudi, E. S.; Mainal, A.; Yahaya, A. H. (2010). **Characterization of chitosan in acetic acid: rheological and thermal studies.** *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 47-56.
- European Food Safety Authority (2006). **Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to an application on the use of cassia gum**



- as a food additive.** *The ESFA Journal*, 389, 1-16.
- Fannon, J. E.; Hauber, R. J.; BeMiller, J. N. (1992). **Surface poros of starch granules.** *Cereal Chemistry*, 69, 284-288.
- FAOSTAT. (2012). **Food and Agriculture Organization of the United Nations - for a world without hunger.** Disponível em <http://faostat.fao.org>, acesso em 08 de Março de 2014.
- Ferrero, C.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. (1996). **Effect of hydrocolloids on starch thermal transitions, as measured by DSC.** *Journal of Thermal Analysis*, 47, 1247-1266.
- Fischer, P.; Windhab, E. J. (2011). **Rheology of food materials.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 36-40.
- Funami, T.; Kataoka, Y.; Omoto, T.; Goto, Y.; Asai, I.; Nishinari, K. (2005a). **Effects of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch.** *Food Hydrocolloids*, 19, 1-13.
- Funami, T.; Kataoka, Y.; Omoto, T.; Goto, Y.; Asai, I.; Nishinari, K. (2005b). **Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behavior of starch. 2a. Functions of guar gums with different molecular weights on the gelatinization behavior of corn starch.** *Food Hydrocolloids*, 19, 25-36.
- Funami, T.; Kataoka, Y.; Omoto, T.; Goto, Y.; Asai, I.; Nishinari, K. (2005c). **Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behavior of starch. 2b. Functions of guar gums with different molecular weights on the retrogradation behavior of corn starch.** *Food Hydrocolloids*, 19, 25-36.
- Funami, T.; Kataoka, Y.; Noda, S.; Hiroe, M.; Ishiara, S.; Asai, I.; Takahashi, R.; Nishinari, K. (2008a). **Functions of fenugreek gum with various molecular weights on the gelatinization and retrogradation behaviors of corn starch-1: Characterizations of fenugreek gum and investigations of corn starch/fenugreek gum composite system at a relatively high starch concentration; 15 w/v%.** *Food Hydrocolloids*, 22, 763-776.
- Funami, T.; Kataoka, Y.; Noda, S.; Hiroe, M.; Ishiara, S.; Asai, I.; Takahashi, R.; Inouchi, N.; Nishinari, K. (2008b). **Functions of fenugreek gum with various molecular weights on the gelatinization and retrogradation behaviors of corn starch-2: Characterizations of starch and investigations of corn starch/fenugreek gum**

- composite system at a relatively low starch concentration; 5 w/v%. *Food Hydrocolloids*, 22, 777-787.**
- Funami, T. (2009). **Functions of food polysaccharides to control the gelatinization and retrogradation behaviors of starch in an aqueous system in relation to the macromolecular characteristics of food polysaccharides. *Food Science and Technology Research*, 15, 557- 568.**
- Funami, T. (2011). **Next target for food hydrocolloid studies: texture design of foods using hydrocolloid technology. *Food Hydrocolloids*, 25, 1904-191.**
- Gibson, T. S.; Al Qalla, H.; McCleary, B. V. (1991). **An improved enzymatic method for the measurement of starch damage in wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 15, 15-27.**
- Gibson, T. S.; Solah, V. A.; McCleary, B. V. (1997). **A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *Journal of Cereal Science*, 25, 111-119.**
- Goñi, O.; Escribano, M.I.; Merodio, C. (2008). **Gelatinization and retrogradation of native starch from cherimoya fruit during ripening, using differential scanning calorimetry. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 303-310.**
- Griffiths, P. R.; Haseth, J. A. (2007). **Fourier transform infrared spectrometry. EUA: Wiley, 529p.**
- Gunaratne, A.; Corke, H. (2007). **Influence of prior acid treatment on acetylation of wheat, potato and maize starches. *Food Chemistry*, 105, 917-925.**
- Han, Z.; Zeng, X.; Zhang, B.; Yu, S. (2009). **Effects of pulsed electric fields (PEF) treatment on the properties of corn starch. *Journal of Food Engineering*, 93, 318-323.**
- Hansen, L. M.; Hosney, R. C.; Faubion, J. M. (1991). **Oscillatory rheometry of starch-water systems: effect of starch concentration and temperature. *Cereal Chemistry*, 68, 347-351.**
- Heyman, B.; De Vos, W. H.; Depypere, F.; Van der Meeren, P.; Dewettinck, K. (2014). **Guar and xanthan gum differentially affect shear induced breakdown of native waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*, 35, 546 - 556.**
- Hirashima, M.; Takahashi, R.; Nishinari, K. (2005). **Effects of adding acids before and after gelatinization on the viscoelasticity of corn starch pastes. *Food***

- Hydrocolloids*, 19, 909-914.
- Hirashima, M.; Takahashi, R.; Nishinari, K. (2012). **The gelatinization and retrogradation of corn starch gels in the presence of citric acid.** *Food Hydrocolloids*, 27, 390-393.
- Hoseney, R. C. (1991). **Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales.** Editora Acribia, S.A. Zaragoza – España, 321p.
- Hoover, R. (2001). **Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review.** *Carbohydrate polymers*, 45, 253-267.
- Horn, M. M.; Martins, V. C. A.; Plepis, A. M. G. (2011). **Effects of starch gelatinization and oxidation on the rheological behavior of chitosan/starch blends.** *Polymer International*, 60, 920-923.
- Huang, C-C. (2009). **Physicochemical, pasting and thermal properties of tuber starches as modified by guar gum and locust bean gum.** *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 50-57.
- Huijbrechts, A. M. L.; Desse, M.; Budtova, T.; Franssen, M. C. R.; Visser, G. M.; Boeriu, C. G.; Sudhölter, E. J. R. (2008). **Physicochemical properties of etherified maize starches.** *Carbohydrate Polymers*, 74, 170-184.
- Jane, J.; Chen, Y. Y.; Lee, L. F.; McPherson, A. E.; Wong, K. S.; Radosavljevic, M.; Kasemsuwan. (1999). **Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch.** *Cereal Chemistry*, 76, 629-637.
- Ji, Y.; Wong, K.; Hasjim, J.; Pollak, L. M.; Duvick, S.; Jane, J.; White, P. J. (2003a). **Structure and function of starch from advanced generations of new corn lines.** *Carbohydrate Polymers*, 54, 305-319.
- Ji, Y.; Seetharaman, K.; Wong, K.; Pollak, L. M.; Duvick, S.; Jane, J.; White, P. J. (2003b). **Thermal and structural properties of unusual starches from developmental corn lines.** *Carbohydrate Polymers*, 51, 439-450.
- Jindal, M.; Kumar, V.; Rana, V.; Tiwary, A. K. (2013). **Exploring potential new gum source Aegle marmelos for food and pharmaceuticals: Physical, chemical and functional performance.** *Industrial Crops and Products*, 45, 312-318.
- Juliano, B. O. (1971). **A simplified assay for milled-rice amylase.** *Cereal Science Today*, 16, 334-340.

- Kaity, S.; Isaac, J.; Kumar, P. M.; Bose, A.; Wong, T. W.; Ghosh, A. (2013). **Microwave assisted synthesis of acrylamide grafted locust bean gum and its application in drug delivery.** *Carbohydrate Polymers*, 98, 1083-1094.
- Kasaai, M. R. (2008). **A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy.** *Carbohydrate Polymers*, 71, 497-508.
- Kasai, M.; Tanihata, S.; Ohishi, K.; Shimada, A.; Hatae, K. (2001). **Effect of acetic acid on the palatability and physicochemical properties of cooked rice.** *Journal of Home Economics of Japan*, 52, 1091-1097.
- Karim, A. A.; Norziah, M. H.; Seow, C. C. (2000). **Methods for the study of starch retrogradation. Review.** *Food Chemistry*, 71, 9-36.
- Kaur, L.; Singh, N.; Sodhi, N. S. (2002). **Some properties of potatoes and their starches II. Morphological, thermal and rheological properties of starches.** *Food Chemistry*, 79, 183-192.
- Kaur, L.; Singh, N.; Singh, J., (2004). **Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches.** *Carbohydrate Polymers*. 55, 211-223.
- Kaur, L; Singh, J.; Singh, H.; McCarthy, O. J. (2008). **Starch-cassia gum interactions: A microstructure-rheology study.** *Food Chemistry*, 111, 1-10.
- Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B (1998). **Rheological characterization of biopolymer gel.** *Progress in Polymer Science*, 23, 533-568.
- Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S. (2002). **Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods.** *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5, 205-212.
- Kim, C.; Lee, S. P.; Yoo, B. (2006). **Dynamic rheology of rice starch-galactomannan mixtures in the aging process.** *Starch/Stärke*, 58, 35-43.
- Kim, W.; Yoo, B. (2009). **Rheological behaviour of acorn starch dispersions: effects of concentration and temperature.** *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 503-509.
- Kim, H-S.; Patel, B.; BeMiller, J. N. (2013). **Effects of the amylose-amylopectin ratio on starch-hydrocolloid interactions.** *Carbohydrate Polymers*, in press.
- Kizil, R.; Irudayaraj, J.; Seetharaman. (2002). **Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy.** *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry*, 50, 3912-3918.

- Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. (2010). **Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review.** *International Journal of Food Microbiology*, 144, 5-63.
- Korus, J.; Juszczak, L.; Witczak, M.; Achremowicz, B. (2004). **Influence of selected hydrocolloids on triticale starch rheological properties.** *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 641-652.
- Kowalski, S.; Sikora, M.; Tomasik, P.; Krystyjan, M. (2008). **Starch polysaccharide hydrocolloid gels.** *Polimery*, 53, 457-464.
- Kuakpetoon, D.; Wang, Y. (2007). **Internal structure and physicochemical properties of corn starches as revealed by chemical surface gelatinization.** *Carbohydrate Research*, 342, 2253-2263.
- Kuhnen, S.; Ogliari, J. B.; Dias, P. F.; Boffo, E. F.; Correia, I.; Ferreira, A. G.; Delgadillo, I.; Maraschin, M. (2010). **ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil.** *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1673-1685.
- Kulicke, W. M.; Eidam, D.; Kath, F.; Kix, M.; Kull, A. H. (1996). **Hydrocolloids and rheology: Regulation of viscoelastic characteristics of waxy rice starch in mixtures with galactomannans.** *Starch/Stärke*, 48, 105-114.
- Kumar, M. N. V. R. (2000). **A review of chitin and chitosan applications.** *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Krüger, A.; Ferrero, C.; Zaritzky, N. E. (2003). **Modelling corn starch swelling in batch systems: Effect of sucrose and hydrocolloids.** *Journal of Food Engineering*, 58, 125-133.
- Lambert, J. B.; Shurvell, H. F.; Lightner, D. A.; Cooks, R. G. (2001). **Organic Structural Spectroscopy.** Prentice Hall: Upper Saddle River, 568 p.
- Lapasin, R.; Prich, S. (1995). **Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications.** *Blackie Academic & Professional*, London, 620 p.
- Lawal, O. S. (2004). **Succinyl and acetyl starch derivatives of a hybrid maize: physicochemical characteristics and retrogradation properties monitored by differential scanning calorimetry.** *Carbohydrate Research*, 339, 2673-2682.
- Lawal, O. S.; Adebawale, K. O.; Ogunsanwo, B. M.; Barba, L. L. (2005). **Oxidized and**

- acid thinned starch derivatives of hybrid maize: functional characteristics, wide-angle X-ray diffractometry and thermal properties.** *International Journal of biologic macromolecules*, 35, 71-79.
- Leach, H. W.; McCowen, L. D.; Schoch, T. J. (1959). **Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches.** *Cereal Chemistry*, 36, 534-544.
- Lee, M. H.; Baek, M. H.; Cha, D. S.; Park, H. J.; Lim, S. T. (2002). **Freeze-thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums.** *Food Hydrocolloids*, 16, 345-352.
- Leceta, I.; Guerrero, P.; de la Caba, K. (2013). **Functional properties of chitosan-based films.** *Carbohydrate Polymers*, 93, 339-346.
- Leite, T. D.; Nicoleti, J. F.; Penna, A. L. B.; Franco, C. M. L. (2012). **Effect of addition of different hydrocolloids on pasting, thermal, and rheological properties of cassava starch.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32, 579-587.
- Lewandowska, K. (2011). **Miscibility and interactions in chitosan acetate/poly (N-vinylpyrrolidone) blends.** *Thermochimica Acta*, 517, 90-97.
- Li, J.; Berke, T. G.; Glover, D. V. (1994). **Variation for thermal properties of starch in tropical maize germ plasm.** *Cereal Chemistry*, 71, 87-90.
- Li, J. H.; Vasanathan, T.; Rossnagel, B.; Hoover, R. (2001). **Starch from hull-less barley: I. Granule morphology, composition and amylopectin structure.** *Food Chemistry*, 74, 395-405.
- Li, J. Y., Yeh, A. (2001). **Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches.** *Journal of Food Engineering*, 50, 141-148.
- Lin, B.; Du, Y.; Li, Y.; Liang, X.; Wang, X.; Deng, W.; Wang, X.; Li, L.; Kennedy, J. F. (2010). **The effect of moist heat treatment on the characteristic of starch-based composite materials coating with chitosan.** *Carbohydrate Polymers*, 81, 554-559.
- Liu, Q. (2005). **Starch Modifications and Applications.** In: Cui, S. W (Ed.). *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*, CRC Press, 357-406.
- Liu, H.; Xie, F.; Yu, L.; Chen, L.; Li, L. (2009a). **Thermal processing of starch-based polymers.** *Progress in Polymer Science*, 34, 1348-1368.

- Liu, H.; Yu, L.; Simon, G.; Zhang, X.; Dean, K.; Chen, L. (2009b). **Effect of annealing and pressure on microstructure of corn starches with different amylose/amylopectin ratios.** *Carbohydrate Research*, 344, 350-354.
- Liu, H.; Adhikari, R.; Qipeng, G.; Adhikari, B. (2013). **Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films.** *Journal of Food Engineering*, 116, 588-597.
- Lopes da Silva, J. A.; Cardoso, S. M.; Tavares, C.; Monteiro, S. R. (2004). **Reologia de biopolímeros: dispersões e géis.** In: Melo, J. S. S.; Moreno, M. J.; Burrows, H. D.; Gil, M. H. (Eds.). *Química de Polímeros*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, p.571-590.
- López, O. V.; Zaritzky, N. E.; García, M. A. (2010). **Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity.** *Journal of Food Engineering*, 100, 160-168.
- Lu, Z.; Sasaki, T.; Li, Y.; Yoshihashi, T.; Li, L.; Kohyama, K. (2009). **Effect of amylose content and rice type on dynamic viscoelasticity of a composite rice starch gel.** *Food Hydrocolloids*, 23, 1712-1719.
- Ma, X; Pawlik, M. (2007). **Intrinsic viscosities and Huggins constants of guar gum in alkali metal chloride solutions.** *Carbohydrate Polymers*, 70, 15-24.
- Mali, S.; Ferrero, C.; Redigonda, V.; Beleia, A.P.; Grossmann, M.V.E.; Zaritzky, N.E. (2003). **Influence of pH and hydrocolloids addition on yam (*Dioscorea alata*) starch pastes stability.** *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36, 475-481.
- Mandala, I. G. (2012). **Viscoelastic properties of starch and non-starch thickeners in simple mixtures or model food.** In: *Viscoelasticity – From theory to biological applications*, Vicente, J. (Ed.), Croatia, 217-236.
- Martins, J. T.; Cerqueira, M. A.; Vicente, A. A. (2012a). **Influence of a-tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films.** *Food Hydrocolloids*, 27, 220-227.
- Martins, J. T.; Cerqueira, M. A.; Bourbon, A. I.; Pinheiro, A. C.; Souza, B. W. S.; Vicente, A. A. (2012b). **Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof.** *Food Hydrocolloids*, 29, 280-289.

- Mathew, S.; Abraham, T. E. (2008). **Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films.** *Food Hydrocolloids*, 22, 826-835.
- Matsuguma, L., S. (2006). **Caracterização do amido de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) nativo e modificado por oxidação.** *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- McCleary, B. V.; Solah, V.; Gibson, T. S. (1994). **Quantitative measurement of total starch in cereal flours and products.** *Journal of Cereal Science*, 20, 51-58.
- Mendez-Montealvo, G.; Sánchez-Rivera, M. M.; Paredes-López, O.; Bello-Pérez, L. A. (2006). **Thermal and rheological properties of nixtamalized maize starch.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 59-63.
- Moser, P.; Cornelio, M. L.; Telis, V. R. N. (2013). **Influence of the concentration of polyols on the rheological and spectral characteristics of guar gum.** *LWT - Food Science and Technology*, 53, 29-36.
- Moreira, R.; Chenlo, F.; Torres, M. D.; Glazer, J. (2012). **Rheological properties of gelatinized chestnut starch dispersions: effect of concentration and temperature.** *Journal of Food Engineering*, 112, 94-99.
- Morrison, W. R. (1995). **Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality.** *Cereal Foods World*, 40, 437-446.
- Mucha, M. (1997). **Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions.** *Macromolecular Chemistry and Physics*, 198, 471-484.
- Nagano, T.; Tamaki E.; Funami, T. (2008). **Influence of guar gum on granule morphologies and rheological properties of maize starch.** *Carbohydrate Polymers*, 72, 95-101.
- Nanaki, S. G.; Koutsidis, I. A.; Koutri, I.; Karavas, E.; Bikiaris, D. (2012). **Miscibility study of chitosan/2-hydroxyethyl starch blends and evaluation of their effectiveness as drug sustained release hydrogels.** *Carbohydrate Polymers*, 87, 1286-1294.
- Noda, T.; Takahata, Y.; Sato, T.; Suda, I.; Morishita, T.; Ishiguro, K.; Yamakawa, O. (1998). **Relationships between chain length distribution of amylopectin and gelatinization properties within the same botanical origin for sweet potato and buckwheat.** *Carbohydrate Polymers*, 37, 153-158.
- Nwokocha, L. M.; Williams, P. A. (2009). **New starches: Physicochemical properties of**



- sweetsop (*Annona squamosa*) and soursop (*Annona muricata*) starches. *Carbohydrate Polymers*, 78, 462-468.
- Oates, C. G. (1997). **Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis.** *Trends in Food Science and Technology*, 8, 375-382.
- Okuyama, K.; Noguchi, K.; Kanenari, M.; Egawa, T.; Osawa, K. (2000). **Structural diversity of chitosan and its complexes.** *Carbohydrate Polymers*, 41, 237-247.
- Ohishi, K.; Kasai, M.; Shimada, A.; Hatae, K. (2007). **Effects of acetic acid on the rice gelatinization and pasting properties of rice starch during cooking.** *Food Research International*, 40, 224-231.
- Osman, Z.; Arof, A. K. (2002). **FTIR studies of chitosan acetate based polymers electrolytes.** *Electrochimica Acta*, 48, 993 - 999.
- Osundahunsi, O. F.; Seidua, K. T.; Mueller, R. (2011). **Dynamic rheological and physicochemical properties of annealed starches from two cultivars of cassava.** *Carbohydrate Polymers*, 83, 1916-1921.
- Pantidol, J.; Wang, Y. J. (2002). **Fine structures of starches from long grain cultivars with different functionality.** *Cereal Chemistry*, 79, 465-469.
- Parker, R.; Ring, S. G. (2001). **Aspects of the physical chemistry of starch.** *Journal of Cereal Science*, 33, 1-17.
- Ptaszek, P.; Grzesik, M. (2007). **Viscoelastic properties of maize starch and guar gum gels.** *Journal of Food Engineering*, 82, 227-237.
- Ptaszek, A.; Berski, W.; Ptasek, P.; Witczak, T.; Repelewicz, U.; Grzesik, M. (2009). **Viscoelastic properties of waxy maize starch and selected non-starch hydrocolloids gels.** *Carbohydrate Polymers*, 76, 567-577.
- Pereira, R. C. (2006). **Relação entre características estruturais e bioquímicas e a textura do grão de milho.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras.
- Prajapati, V., D.; Jani, G. K.; Moradiya, N. G.; Randeria, N. P.; Nagar, B. J. (2013a). **Locust bean gum: A versatile biopolymer.** *Carbohydrate Polymers*, 94, 814 - 821.
- Prajapati, V., D.; Jani, G. K.; Moradiya, N. G.; Randeria, N. P.; Nagar, B. J.; Naikwadi, N. N.; Variya, B. C. (2013b). **Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 83-92.
- Pillai, C.K.S; Paul, W.; Sharma, C. P. (2009). **Chitin and chitosan polymers: chemistry,**

- solubility and fiber formation.** *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.
- Raeker, M. O.; Gaines, C. S.; Finney, P. L.; Donelson, T. (1998). **Granule size distribution and chemical composition of starches from 12 soft wheat cultivars.** *Cereal Chemistry*, 75, 721-728.
- Razavi, S. M. A.; Cui, S. W.; Guo, Q.; Ding, H. (2014). **Some physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum.** *Food Hydrocolloids*, 35, 453 - 462.
- Rinaudo, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J. (1999). **Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan.** *Polymer*, 40, 7029-7032.
- Rinaudo, M. (2006). **Chitin and chitosan: properties and applications.** *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Ritthidej, G. C.; Phaechamud, T.; Koizumi, T. (2002). **Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films.** *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 11-22.
- Rojas, J. A.; Rosell, C. M.; Benedito de Barber, C. (1999). **Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems.** *Food Hydrocolloids*, 13, 27-33.
- Ross-Murphy, S. B. (1984). **Rheological methods.** In: H. W. S. Chan (Ed.), *Biophysical methods in food research*. London: Blackwell Scientific Publications.
- Rosalina, I.; Bhattacharya, M. (2002). **Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels.** *Carbohydrate Polymers*, 48, 191-202.
- Rosell, C. M.; Yokoyama, W.; Shoemaker, C. (2011). **Rheology of different hydrocolloids-rice starch blends. Effect of successive heating-cooling cycles.** *Carbohydrate Polymers*, 84, 373-382.
- Sandhu, K.S., Singh, N., Kaur, M. (2004). **Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches.** *Journal of Food Engineering*, 64, 119-127.
- Sandhu, K. S.; Narpinder, S.; Malhi, N. S. (2005). **Physicochemical and thermal properties of starches separated from corn produced from crosses of two germ pools.** *Food Chemistry*, 89, 541-548.
- Sandhu, K. S.; Singh, N. (2007). **Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties.** *Food Chemistry*, 101, 1499-1507.

- Sandhu, K. S.; Singh, N.; Lim, S. (2007). **A comparison of native and acid thinned normal and waxy starches: physicochemical, thermal, morphological and pasting properties.** *Food Science and Technology*, 40, 1527-1536.
- Santos; D. M. J.; Gama, A. C.; Lopes da Silva, J. A. (2002). **A rheological study of wheat starch-water-soluble pentosan mixtures under hydrothermal gelling conditions.** *Journal of Food Science*, 67, 3372-3380.
- Santos, J. E.; Soares, J. P; Dockal, E. R; Campana Filho, S. P; Cavaleiro, E. T. G. (2003). **Characterization of commercial chitosan from different suppliers.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 14, 242-249.
- Santos, C.; Seabra, P.; Veleirinho, B.; Delgadillo, I; Lopes da Silva, J. A. (2006). **Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes.** *European Polymer Journal*, 42, 3277-3285.
- Santos, Z. M.; Caroni, A. L. P. F.; Pereira, M. R.; Silva, D. R.; Fonseca, J. L. C. (2009). **Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis.** *Carbohydrate Research*, 344, 2591-2595.
- Sasaki, T.; Matsuki, J. (1998). **Effect of wheat starch structure on swelling power.** *Cereal Chemistry*, 75, 525-529.
- Sasaki, T.; Yasui, T.; Matsuki, J. (2000). **Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starches from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds.** *Cereal Chemistry*, 77, 58-63.
- Schirmer, M.; Höchstätter, A.; Jekle, M.; Arendt, E.; Becker, T. (2013). **Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio.** *Food Hydrocolloids*, 32, 52-63.
- Schramm, S. (2006). **Reologia e reometria – fundamentos teóricos e práticos.** São Paulo: Artliber editora, 232p.
- Schulz, H.; Baranska, M. (2007). **Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. Review.** *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13-25.
- Seguchi, M. (1995). **Surface staining of wheat starch granules with remazolbrilliant blue R dye and their extraction with aqueous sodium dodecyl sulfate and**

- mercaptoetanol.** *Cereal Chemistry*, 72, 602-607.
- Serrero, A.; Trombotto, S.; Cassagnau, P.; Bayon, Y.; Gravagna, P.; Montanari, S.; David, L. (2010). **Polysaccharide gels based on chitosan and modified starch: structural characterization and linear viscoelastic behavior.** *Biomacromolecules*, 11, 1534-1543.
- Sevenou, O.; Hill, S. E.; Farhat, I. A.; Mitchell, J. R. (2002). **Organization of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 79-85.
- Shi, Y.C.; Capitani, T.; Trzasko, P.; Jeffcoat, R. (1998). **Molecular structure of a low amylopectin starch and other high-amylose maize starches.** *Journal of Cereal Science*, 27, 289-299.
- Shi, Y. C.; Seib, P. A (1995). **Fine structure of maize starches from four wx-containing genotypes of the W64A inbred line in relation to gelatinization and retrogradation.** *Carbohydrate Polymers*, 26, 141-147.
- Sikora, M.; Tomasik, P.; Krystyjan, M. (2010). **Characterization of potato starch fractions and their interaction with hydrocolloids.** *Starch/Stärke*, 62, 341-349.
- Sierakowski, M. R.; Milas, M.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. (2000). **Specific modifications of galactomannans.** *Carbohydrate Polymers*, 42, 51-57.
- Singh, N.; Eckhoff, S. R. (1996). **Wet milling of corn – A review of laboratory-scale and pilot plant-scale procedures.** *Cereal Chemistry*, 73, 659-667.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N.S., Gill, B.S. (2003). **Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Review.** *Food Chemistry*, 81, 219-231.
- Singh, N.; Inouchi, N.; Nishinari, K. (2006). **Structural, thermal and viscoelastic characteristics of starches separated from normal, sugary and waxy maize.** *Food Hydrocolloids*, 20, 923-935.
- Singh, J.; Kaur, L.; McCarthy, O. J. (2007). **Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications. A review.** *Food Hydrocolloids*, 21, 1-22.
- Sodhi, N. S.; Singh, N. (2003). **Morphological, thermal and rheological properties of starches separated from rice cultivars grown in India.** *Food Chemistry*, 80, 99-

- Soxhlet, F. (1879). **Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes.** *Polytechnisches Journal*, 232, 461-465.
- Svihus, A. C.; Uhlen, A. K.; Harstad, O. M. (2005). **Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review.** *Animal Feed Science and Technology*, 122, 303-320.
- Steffe, J. F. (1996). **Rheological Methods in Food Process Engineering.** USA: Freeman press, 418p.
- Stuart, B. (2004). **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.** England: Wiley. 224p.
- Šubarić, D.; Babić, J.; Ačkar, D.; Piližota, V.; Kopjar, M.; Ljubas, I.; Ivanovska, S. (2011). **Effect of galactomannan hydrocolloids on gelatinization and retrogradation of tapioca and corn starch.** *Croatian Journal of Food Science*, 3, 26-31.
- Sudhakar, V.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P. R. (1996). **Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects.** *Food Chemistry*, 55, 259-264.
- Taggart, P. (2004). **Starch as an ingredient: manufacture and applications.** In: Eliasson, A. C. (Ed.). *Starch in food: Structure, function and applications.* New York: CRC Press, p.363-392.
- Tang, H.; Ando, H.; Watanabe, K.; Takeda, Y.; Mitsunaga, T. (2000). **Some physicochemical properties of small-, medium-, and large-granule starches in fractions of waxy barley grain.** *Cereal Chemistry*, 77, 27-31.
- Techawipharat, J.; Supphantharika, M.; BeMiller, J. N. (2008). **Effects of cellulose derivatives and carrageenans on the pasting, paste, and gel properties of rice starches.** *Carbohydrate Polymers*, 73, 417 – 426.
- Tester, R.; Morrison, W. R. (1990). **Swelling and gelatinization of cereal starches. Effects of amylopectin, amylose, and lipids I.** *Cereal Chemistry*, 67, 551-557.
- Tester, R. F.; Karkalas, J. (1996). **Swelling and gelatinization of oat starches.** *Cereal Chemistry*, 73, 271-277.
- Tester, R. F. (1997). **Properties of damaged starch granules: composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures.** *Food Hydrocolloids*, 11, 293-301.
- Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X. (2004). **Starch-composition, fine structure and**

- architecture. Review.** *Journal of Cereal Science*, 39, 151-165.
- Tziotis, A.; Seetharaman, K.; Klucinec, J. D.; Keeling, P.; White, P. J. (2005). **Functional properties of starch from normal and mutant corn genotypes.** *Carbohydrate Polymers*, 61, 238-247.
- Toneli, J. T. C. L.; Murr, F. E. X.; Park, K. J. (2005). **Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 7, 181-204.
- Torres, M. D.; Moreira, R.; Chenlo, F.; Morel, M. H. (2013). **Effect of water and guar gum content on thermal properties of chestnut flour and its starch.** *Food Hydrocolloids*, 33, 192-198.
- Tromp, R. H.; van de Velde, F.; van Riel, J.; Paques, M. (2001). **Confocal scanning microscopy (CLSM) on mixtures of gelatine and polysaccharides.** *Food Research International*, 34, 931-938.
- Tuhin, M. O.; Rahman, N.; Haque, M. E.; Khan, R. A.; Dafader, N. C.; Islam, R.; Nurnabi, M.; Tonny, W. (2012). **Modification of mechanical and thermal property of chitosan–starch blend films.** *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1659-1668.
- van Soest, J. J. G.; Tournois, H.; Wit, D.; Vliegenthart, J. F. G. (1995). **Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy.** *Carbohydrate Research*, 279, 201-214.
- Vasanthan, T. (2001). **Overview of laboratory isolation of starch from plant materials.** *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Ward, K. E. J.; Hosney, R. C.; Seib, P. A. (1994). **Retrogradation of amylopectin from maize and wheat starches.** *Cereal Chemistry*, 71, 150-155.
- Wang, Y-J.; Truong, V-D.; Wang, L. (2003). **Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis.** *Carbohydrate Polymers*, 52, 327-333.
- Watanabe, E.; Bell, A. E.; Brockway, B. E. (1998). **The effect of protein disulphide isomerase on dough rheology assessed by fundamental and empirical testing.** *Food Chemistry*, 61, 481-486.
- Wallace, J. C.; Lopes, M. A.; Paiva, E.; Larkins, B. A. (1990). **New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of Y-zein in modified opaque-2 maize.** *Plant Physiology*, 92, 191-196.

- Weber, F. H.; Collares-Queiroz, F. P.; Chang, Y. K. (2009). **Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 748-753.
- White, P. J.; Abbas, I. R.; Pollak, L. M.; Johnson, L. A. (1990). **Intra- and interpopulation variability of thermal properties of maize starch.** *Cereal Chemistry*, 67, 70-73.
- White, P. J. **Properties of corn starch.** (2001). In: Hallauer, A.R. (Ed.). *Specialty corns*. 2<sup>a</sup> ed., London, Boca Raton, CRC Press. CD ROM.
- Williams, P. A.; Phillips, G. O. **Interactions in mixed polysaccharides systems.** (1995). In: Stephen, A. M.; Phillips, G. O.; Williams, P. A. (Eds). *Food Polysaccharides and Their Applications*. New York: CRC Press, p.483-500.
- Wilson, R. H.; Tapp, H. S. (1999). **Mid-infrared spectroscopy for food analysis: recent new applications and relevant developments in sample presentation methods.** *Trends in analytical chemistry*, 18, 85-93.
- Würsch, P.; Gumy, D. (1994). **Inhibition of amylopectin retrogradation by partial beta-amyolysis.** *Carbohydrate Research*, 256, 129-137.
- Wunderlich, B. (2000). **Temperature-modulated calorimetry in the 21st century.** *Thermochimica Acta*, 355, 43-57.
- Xia, L.; Wenyan, G.; Qianqian, J.; Yuzhuo, X. (2012). **Physicochemical, morphological, and thermal properties of starches separated from bulbs of four Chinese lily cultivars.** *Starch/Stärke*, 64, 545-551.
- Xiao-Peng, H.; Chang-Lan, Z.; Ling-Long, L.; Jun-Ru, F.; Ling, J.; Wen-Wei, Z.; Yi-Bai, L.; Jian-Min, W. (2010). **Difference of amylopectin structure among rice varieties differing in grain quality and its correlations with starch physicochemical properties.** *Acta Agronomica Sinica*, 36, 276-284.
- Xu, Y. X.; Kim, K. M.; Hanna, M. A.; Nag, D. (2005). **Chitosan – starch composite film: preparation and characterization.** *Industrial Crops and Products*, 21, 185-192.
- Xu, Z.; Zhong, F.; Li, Y.; Shoemaker, C. F.; Yokoyama, W. H.; Xia, W. (2012). **Effect of polysaccharides on the gelatinization properties of corn starch dispersions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 658-664.
- Yoo, D.; Kim, C.; Yoo, B. (2005). **Steady and dynamic shear rheology of rice starch-galactomannan mixtures.** *Starch/Stärke*, 57, 310-318.

- Zhang, Y. R.; Wang, X. L.; Zhao, G. M.; Wang, Y. Z. (2012). **Preparation and properties of oxidized starch with high degree of oxidation.** *Carbohydrate Polymers*, 87, 2554-2562.
- Zobel, H. F. (1992). **Starch: sources, production, and properties.** In: Schenck, F.; Wah, R. E. (Eds). *Starch hydrolysis products*. New York: VCH Publishers, p.23-44.
- Zhong, Y.; Song, X.; Li, Y. (2011). **Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types.** *Carbohydrate Polymers*, 84, 335-342.